

Somatische Mosaik und atypische Deletionen bei Patienten mit Prader-Willi- und Angelman-Syndrom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Hülya Nazlıcan

aus Essen

Oktober 2005

Die der Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Esche

3. Gutachter: /

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. M. Heil

Tag der mündlichen Prüfung: 11.01.2006

Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht (in der Reihenfolge ihres Erscheinens):

- Horsthemke B**, Nazlican H, Husing J, Klein-Hitpass L, Claussen U, Michel S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K (2003) Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum Mol Genet* **12**: 2723-2732.
- Nazlican H**, Zeschnigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillessen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* **13**: 2547-2555.
- Wey E**, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A (2005) Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* **3**: 273-277.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Genomisches Imprinting	1
1.2	Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom	6
1.2.1	Die PWS- und AS-Region	7
1.2.2	Molekulargenetische Ursachen des PWS und AS	11
1.2.3	Mausmodelle für Defekte in der PWS- und AS-Region	15
1.3	Zielsetzung	16
2.	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Standardlösungen und –Medien	17
2.1.3	Enzyme	17
2.1.4	Vektoren	18
2.1.5	Bakterienstämme	18
2.1.6	Klone	18
2.1.7	Oligonukleotide	18
2.1.7.1	Oligonukleotide für die X-Inaktivierungs-Untersuchung	18
2.1.7.2	Oligonukleotide für die Klonierung von Bisulfit-DNA	19
2.1.7.3	Hybridisierungssonden	19
2.1.8	Patienten	19
2.1.8.1	Patienten mit AS und einem atypischen Methylierungsmuster	19
2.1.8.2	Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp bzw. Teilsymptomen für PWS	20
2.2	Methoden	21
2.2.1	Isolierung von DNA aus peripherem Blut	21
2.2.1.1	DNA-Präparation mit FlexiGene	21
2.2.1.2	DNA-Präparation mit dem BioRobot EZ1 Workstation	21
2.2.2	Isolierung von DNA aus Fibroblasten	21
2.2.3	Präparation von Plasmid-DNA	22
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNA	23
2.2.5	Restriktionsspaltung von DNA	23
2.2.6	Bisulfit-Behandlung von DNA	24
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.8	Gelelektrophorese	25
2.2.9	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	26
2.2.9.1	Microcon-Methode	26
2.2.9.2	Aufreinigung mit dem MinElute PCR-Purification Kit (Qiagen)	26
2.2.9.3	Aufreinigung mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)	26
2.2.10	Realtime-PCR (TaqMan®)	27
2.2.10.1	Quantitative Analyse von methylierten Allelen mittels Realtime-PCR	28
2.2.10.2	Deletions-Analyse von snoRNA-Genen mittels Realtime-PCR	29

2.2.11	Multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH).....	30
2.2.11.1	Herstellung der Sonden.....	30
2.2.11.2	Hybridisierung auf Nylon-Filter	32
2.2.11.3	PCR mit den Vektorspezifischen Primern	32
2.2.12	Sequenzierung von DNA	33
2.2.13	Southern-Blot-Analyse	33
2.2.13.1	Southern-Blot.....	33
2.2.13.2	Radioaktive Markierung von DNA.....	34
2.2.13.3	Hybridisierung	34
2.2.13.4	Autoradiographie	35
2.2.14	Subklonierung von DNA-Fragmenten	35
2.2.14.1	Vektor-DNA	35
2.2.14.2	Insert-DNA	35
2.2.14.3	Ligation	35
2.2.14.4	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	35
2.2.15	Klonierung von Fibroblasten	36
3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Somatisches Mosaik in Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt	38
3.1.1	Methylierungs-Auffälligkeiten in 26 ASID-Patienten.....	38
3.1.2	Methylierungs-Mosaik in zwei AS-Patienten.....	39
3.1.2.1	Bisulfit-Sequenzierung klonierter PCR-Produkte	39
3.1.2.2	Methylierungs-Analyse von Fibroblasten-Einzelzellklonen	40
3.1.3	Eingrenzung des Zeitpunktes der Imprinting-Defekt-Entstehung mit Hilfe der X-Inaktivierungs-Untersuchung in Einzelzellklonen	41
3.1.4	Quantitative Analyse des zellulären Mosaiks.....	44
3.1.5	Genotyp-Phänotyp-Korrelation mittels der Regressionsanalyse	46
3.2	Somatisches Mosaik in einem Patienten mit PWS und einem Imprinting-Defekt	51
3.2.1	Quantitative Analyse.....	51
3.3	Suche nach strukturellen Veränderungen bzw. Deletionen der snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13	53
3.3.1	Analyse des <i>HBII</i> -85-Genclusters mittels Southern Blot und MAPH Multiplex Amplifiable Probe Hybridization).....	55
3.3.2	Analyse der snoRNA-Gene <i>HBII</i> -13, <i>HBII</i> -436 und <i>HBII</i> -437 mittels der Realtime-PCR	64
3.3.3	Analyse des <i>HBII</i> -438A-Locus	66
4.	DISKUSSION	70
4.1	Imprinting-Defekte bei AS als Folge einer primären Epimutation.....	70
4.1.1	Fehler bei der Imprint-Aufrechterhaltung führt zu einem somatischen Mosaik.....	70
4.1.2	Der Imprinting-Defekt ist kurz nach der Fertilisation entstanden	71
4.1.3	Patienten mit einem höheren Grad an normal methylierten Zellen tendieren zu einem mildereren Krankheitsverlauf	73

4.2	SnoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 als mögliche Kandidaten-Gene für Teilaspekte des PWS-Phänotyps.....	75
4.2.1	Bei Patienten mit Teilaspekten des PWS-Phänotyps liegt keine Deletion der snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 vor	75
4.2.2	Die Eine Deletion 580 bp distal von <i>HBII-438A</i> steht im Kopplungsungleichgewicht mit einem Locus 8 kb telomerisch von <i>HBII-438A</i>	77
5.	ZUSAMMENFASSUNG	78
6.	LITERATUR	79

ABKÜRZUNGEN UND FACHAUSDRÜCKE

A	Adenin
AS	Angelman-Syndrom
ASID	AS mit einem Imprinting-Defekt ohne IC-Deletion
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; Kopie eines RNA Moleküls
cen	Centromer
Ci	Curie
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Orientierung
cpm	<i>counts per minute</i> , Impulse pro Minute
C _T	PCR-Zykluszahl, bei der das Fluoreszenz-Signal eine bestimmte Intensitätsschwelle überschreitet
DMR	Differentiell methylierte Region
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) oder: Gramm
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IC	Imprinting-Center
ID	Imprinting-Defekt
Imprinting	Prägung (elternspezifische Genexpression)
Insert	Passagierfragment eines rekombinanten Klons
invdup 15	Invertierte Duplikation auf dem Chromosom 15
kb	Kilobasenpaar
KEV	Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung
M	Mol/l
MAPH	<i>Multiplex Amplifiable Probe Hybridization</i>
mat	Maternal
Mb	Megabasenpaar
meth	Methyliert
min	Minute
MS-PCR	Methylierungsspezifische PCR
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , USA (www.ncbi.nlm.nih.gov)
NP	Normalperson
OD	Optische Dichte
pat	Paternal
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
Primer	Startermolekül für die DNA-Synthese

PWS	Prader-Willi-Syndrom
QAMA	<i>quantification of methylated alleles</i> , Quantifizierung methylierter Allele
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i> , kleine nukleoläre RNA
SRO	<i>smallest region of deletion overlap</i> , kleinste Überlappung von Deletionen
T	Thymin
TaqMan [®]	Realtime-PCR
tel	Telomer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
unmeth	Unmethyliert
UPD	uniparentale Disomie
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

1. EINLEITUNG

1.1 Genomisches Imprinting

Bestimmte Chromosomenabschnitte werden in der elterlichen Keimbahn spezifisch markiert, so dass nach der Befruchtung nur das väterliche (paternale) oder das mütterliche (maternale) Allel eines Gens aktiv ist. Dieser epigenetische Prozess wird genomisches Imprinting bzw. genomische Prägung genannt (Reik, 1989; Reik und Surani, 1997; Horsthemke *et al.*, 1998; Reik und Walter, 2001). Der Prozess des Imprintings besteht aus mehreren Schritten. In den primordialen Keimzellen wird zunächst die Prägung der elterlichen Chromosomensätze aufgehoben (Imprint-Ausschaltung) und entsprechend des Geschlechts der Keimbahn neu etabliert (Imprint-Etablierung), so dass Spermien einen paternal geprägten Chromosomensatz und Oocyten einen maternal geprägten Chromosomensatz erhalten. Nach der Befruchtung wird diese elternspezifische Prägung aufrechterhalten und an die Tochterzellen weitergegeben (Imprint-Replizierung). Die Imprint-Erkennung im Embryo und adulten Organismus führt zu einer elternspezifischen Genexpression (Horsthemke *et al.*, 1998).

Für eine normale Embryonalentwicklung ist sowohl das paternale als auch das maternale Genom notwendig. Dies konnte durch Transplantationsexperimente von Vorkernen in Mauszygoten gezeigt werden (Surani *et al.*, 1984; Solter, 1987 und 1988). Mit einem diploiden maternalen Chromosomensatz (gynogenetisch) wird zwar ein Embryo gebildet, doch ist das extraembryonale Gewebe (Trophoblast) kaum vorhanden (Surani *et al.*, 1984). Dagegen ist es bei einem diploiden paternalen Chromosomensatz (androgenetisch) genau umgekehrt: Das Trophoblasten-Gewebe wird sehr stark ausgebildet, während der Embryo stark retardiert ist und einige Tage nach der Implantation stirbt (Barton *et al.*, 1984).

Auch beim Menschen sind ähnliche Fälle bekannt: Die Blasenmole ist eine Plazentafehlbildung mit einem diploiden paternalen Chromosomensatz, die aus dem Trophoblasten entsteht, während der Embryoblast verkümmert (Hall, 1990). Hingegen ist in embryonalen Tumoren, den Teratomen, ein diploider maternaler Chromosomensatz zu finden und das Plazentagewebe fehlt.

Es werden zwischen 100 und 200 elternspezifisch geprägter Gene bei der Maus und beim Menschen vermutet (Paoloni-Giacobino und Chaillet, 2004). Inzwischen sind mehr als 50 solcher Gene bekannt (<http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/research/imprinting/imprint-viewdatagenes.html>, <http://www.geneimprint.com/databases/>). Diese Gene treten in

bestimmten bis zu mehreren hundert Kilobasenpaar großen chromosomalen Domänen geclustert, d.h. gehäuft auf (Reik und Maher, 1997; Reik und Walter, 2001). Diese Clusterung von geimprinteten Genen deutet auf eine koordinierte Regulierung der Gene in bestimmten Chromosomendomänen hin. So wurde zum Beispiel auf dem proximalen langen Arm des Chromosoms 15 ein Imprinting-Kontroll-Element, das Imprinting-Center (IC), identifiziert, das für die Regulierung des Imprints und der elternspezifischen Expression notwendig ist (Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996).

Uniparentale Disomien (UPD, siehe 1.2.2) bei der Maus zeigten, dass auf manchen Chromosomen elternspezifisch geprägte Regionen vorhanden sind (Cattanach und Kirk, 1985). Eine UPD liegt vor, wenn zwei homologe Chromosomen denselben elterlichen Ursprung haben. Bei der Maus führen uniparentale Disomien bestimmter Chromosomenpaare abhängig vom elterlichen Ursprung zu einem auffälligen Phänotyp. So konnte gezeigt werden, dass Mausembryonen mit einer maternalen UPD des Chromosoms 11 kleiner und solche mit einer paternalen UPD 11 größer waren als die Geschwistertiere aus dem gleichen Wurf. Dies deutet auf die elternspezifische Expression bestimmter Gene, die entweder auf dem paternalen oder auf dem maternalen Chromosom aktiv sind. Liegen bei einer UPD z.B. zwei maternale Chromosomen vor, fehlt die Expression paternal aktiver Gene und die maternal exprimierte Gene werden biallelisch exprimiert. Auch beim Menschen konnten, aufgrund phänotypischer Auffälligkeiten im Zusammenhang mit einer UPD, chromosomale Regionen, die dem Imprinting unterliegen, identifiziert werden. So führt eine paternale UPD des Chromosoms 6 zu transientem neonatalen Diabetes (Temple *et al.*, 1995; Arima *et al.*, 2001) und eine maternale UPD des Chromosoms 7 zum Silver-Russel-Syndrom (Kotzot *et al.*, 1995). Eine paternale UPD des Chromosoms 11 ist mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom assoziiert (Henry *et al.*, 1991; Slatter *et al.*, 1994; Weksberg *et al.*, 2003). Eine maternale UPD des Chromosoms 14 wurde bei Patienten mit Hypotonie, motorischer Entwicklungsverzögerung, milder fazialer Dysmorphie, niedrigem Geburtsgewicht, Kleinwuchs und vorzeitiger Pubertät beschrieben (Antonarakis *et al.*, 1993; Moon *et al.*, 2002), während eine paternale UPD desselben Chromosoms zur schwerer mentaler Retardierung Muskel- und Skelett-Auffälligkeiten führt (Cotter *et al.*, 1997; Kurosowa *et al.*, 2002). Eine maternale UPD des Chromosoms 15 führt zum Prader-Willi- (Nicholls *et al.*, 1989) und eine paternale UPD zum Angelman-Syndrom (Malcolm *et al.*, 1991; Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997).

Die elterlichen Kopien geprägter Gene unterscheiden sich nicht nur hinsichtlich ihres Expressionsmusters, sondern auch im Hinblick auf den Zeitpunkt der Replikation innerhalb des Zellzyklus (Kitsberg *et al.*, 1993; Knoll *et al.*, 1994). Nicht geprägte genomische DNA

wird in der S-Phase im Zellzyklus synchron repliziert, während in elternspezifisch geprägten Regionen eine asynchrone Replikation stattfindet. In der Regel wird das paternale Allel früher repliziert als das maternale Allel. Die Organisation in Replikationseinheiten ist dabei unabhängig von der Genexpression. D.h. Gene, die gemeinsam auf einer elterlichen Kopie liegen, werden gleichzeitig repliziert, auch wenn sie von entgegengesetzten parentalen Allelen exprimiert werden (Kitsberg *et al.*, 1993). Dieses asynchrone Replikationsmuster wird in den Gameten etabliert und während der gesamten Entwicklung aufrecht erhalten (Simon *et al.*, 1999).

Die differentielle Methylierung von Cytosinresten, die zur Unterscheidung der elterlichen Kopien beiträgt, scheint bei der Regulation der Transkription geprägter Gene eine herausragende Rolle (Reik *et al.*, 1987; Cedar, 1988; Razin und Cedar, 1994) zu spielen. In der Regel ist der Promotorbereich aktiver Genkopien unmethyliert, während er bei inaktiven Kopien methyliert vorliegt (Tate und Bird, 1993; Kass *et al.*, 1997). Die DNA-Methylierung ist ein kovalenter Prozess, bei dem an das 5'-Kohlenstoffatom des Cytosinrestes in Cytosin-Phospho-Guanin-Dinukleotiden (CpG) eine Methylgruppe angehängt wird, so dass ein 5-Methylcytosin entsteht. Die somatischen Genome liegen, mit Ausnahme von CpG-Inseln, global methyliert vor. CpG-Inseln sind mindestens 200 bp große GC-reiche Regionen im 5'-Bereich von Haushaltsgenen und einigen gewebespezifischen Genen mit einem GC-Gehalt von mehr als 50%. Der Quotient der beobachteten CpGs im Vergleich zu den erwarteten CpGs (CpG_{obs}/CpG_{exp}) liegt über 0.6 (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). Der Prozess der Methylierung findet in der Keimbahn und in Embryos nach der Implantation statt. Zwischen dem Tag 10.5 und dem Tag 12.5 in der Embryonalphase der Maus kommt es in den elterlichen primordialen Keimzellen zu einer genomweiten Demethylierung (siehe Abb. 1.1). Es ist nicht bekannt, ob dies ein aktiver oder passiver Prozess ist (Lee *et al.*, 2002; Reik und Walter, 2001). In den ausgereiften Keimzellen findet dann eine genomweite *de novo* Methylierung statt. Welches Enzym dabei einer Rolle spielt, ist nicht bekannt. Mögliche Kandidaten wären die DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) und ihre Isoformen (Mertineit *et al.*, 1998), oder aber die Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b, welche für die *de novo* Methylierung in postimplantierten Embryos verantwortlich sind (Okano *et al.*, 1999; Reik und Walter, 2001). Bei der Replizierung der DNA wird das Methylierungsimprint erkannt und durch die Methyltransferase Dnmt1 auf den Tochterstrang kopiert. Die hemimethylierte DNA wird so vollständig methyliert und dadurch das Methylierungsimprint in den nachfolgenden Zellteilungen aufrecht erhalten (Bestor, 2000; Reik und Walter, 2001). In den nicht geprägten Genen (in der Abb. 1.1 schraffierte rote und blaue Ellipsen) kommt es schon kurz nach der

Fertilisation zu einer erneuten Demethylierung. Während paternale Gene aktiv demethyliert werden, kommt es in den maternalen Genen, durch Fehler in der Aufrechterhaltung des Methylierungsprints in den folgenden Zellteilungen, zu einer passiven Demethylierung (Reik und Walter, 2001). Ab dem Tag E10 der Embryonalphase beginnt die *de novo* Methylierung der nicht geprägten Gene durch die Methyltransferasen Dnmt3a und Dnmt3b. Die Methyltransferase Dnmt3L hat selbst keine katalysierende Aktivität, ist aber essentiell für die Etablierung von Methylierungsmustern in der weiblichen Keimbahn (Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002).

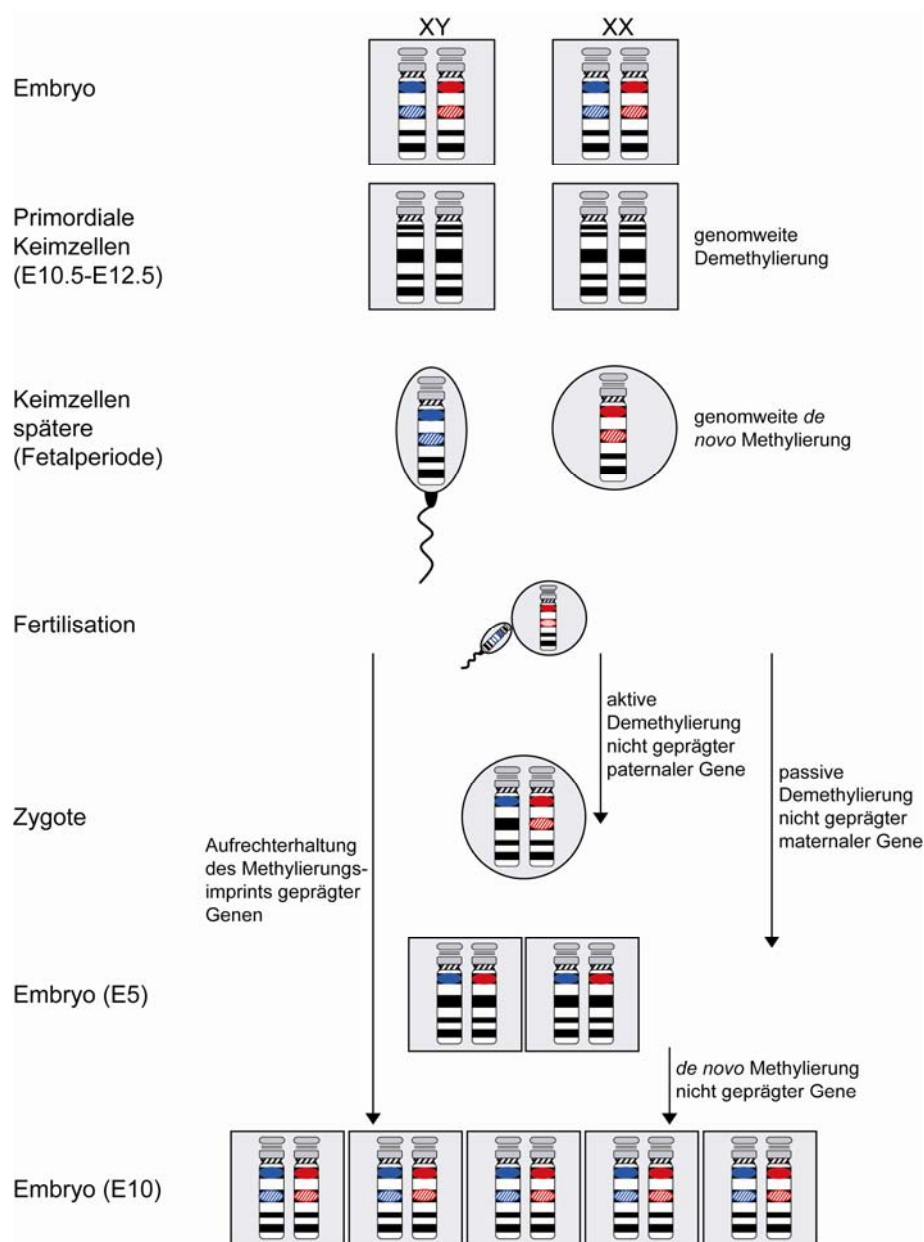


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Reprogrammierung der Methylierungsmuster in der Keimbahn und im Embryo. Geprägte maternale Gene sind durchgehend rot, geprägte paternale Gene sind durchgehend blau und nicht geprägte Gene sind schraffiert dargestellt.

Neben der DNA-Methylierung, scheinen auch andere Faktoren eine Rolle bei der Erhaltung der Prägemuster zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass in geprägten Regionen eine Hypermethylierung mit der Hypoacetylierung von Histonproteinen assoziiert ist (Pedone *et al.*, 1999; Fulmer-Smentek und Francke, 2001). Auf dem Chromosom 7 der Maus befinden sich die reziprok geprägten Gene *Igf2* und *H19* in einem Abstand von 75 kb zueinander. Die homologe Region befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 11p15.5. *Igf2* wird vom paternalen Allel und *H19* vom maternalen Allel exprimiert. Während *H19* auf dem paternalen Allel hypermethyliert und hypoacetyliert vorliegt, befindet sich der Promoter auf dem maternalen Allel in einer offenen Chromatinstruktur und ist acetyliert (Pedone *et al.*, 1999). Im Falle von *Igf2* konnte jedoch keine differentielle Acetylierung von Histonproteinen gefunden werden. Die Regulation der Expression dieser Gene beruht anscheinend auf der gemeinsamen Nutzung zweier transkriptionsverstärkender Elemente (*Enhancer*), die sich 3' von *H19* befinden und wird durch eine differentiell methylierte Region (CTCF-Bindungsstelle) 5' von *H19* beeinflusst (Hark *et al.*, 2000; Szabo *et al.*, 2004). Auf dem maternalen Allel liegt die CTCF-Bindungsstelle unmethyliert vor und der Transkriptionsfaktor CTCF (*CCCTC-binding factor*) kann binden. CTCF fungiert als Isolator und kann die Wechselwirkung zwischen dem *Enhancer* und dem *Igf2*-Promotor verhindern (Bell *et al.*, 1999; Ohlsson *et al.*, 2001, Szabo *et al.*, 2004), so dass die Transkription von *H19* verstärkt wird. Auf dem paternalen Allel verhindert die Methylierung der CTCF-Bindungsstelle die Bindung des Proteins CTCF, so dass der *Igf2*-Promotor mit dem *Enhancer* in Wechselwirkung treten kann und *Igf2* exprimiert wird.

Die Methylierung von Histonproteinen scheint ebenfalls eine wesentliche Rolle bei der Etablierung elternspezifischer Genexpression zu spielen. So konnte für *Neurospora crassa* und *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden, dass die Methylierung von Histon H3 am Lysin 9 (Lys-9) für DNA-Methylierung durch spezifische Methyltransferasen notwendig ist (Tamaru und Selker, 2001; Jackson *et al.*, 2002). Auch für den *SNURF-SNRPN*-Promotor des maternalen Allels in der chromosomalen Region 15q11-q13 konnte bereits eine präferentielle Methylierung von Lys-9 von H3 gezeigt werden (Xin *et al.*, 2001), die von der Histon-Methyltransferase G9a abhängig ist (Xin *et al.*, 2003). Diese multiplen Histon-Modifikationen scheinen koordiniert zu verlaufen und von bestimmten Proteinen interpretiert zu werden (*'histone code'* Hypothese) (Strahl und Allis, 2000).

Obwohl die Natur des primären Imprints letztlich noch unklar ist, scheinen die hier beschriebenen epigenetischen Veränderungen eine wichtige Rolle bei ihrer Erhaltung zu spielen. Da Veränderungen in der Chromatinstruktur und Histonacetylierung nur in

Zusammenhang mit der DNA-Methylierung vorkommen, kann man davon ausgehen, dass die DNA-Methylierung eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der elterlichen Prägung hat (Li *et al.*, 1993).

1.2 Das Prader-Willi-Syndrom und das Angelman-Syndrom

Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) und das Angelman-Syndrom (AS) sind zwei distinkte neurogenetische Erkrankungen. Patienten mit PWS zeigen nach der Geburt eine ausgeprägte muskuläre Hypotonie (Muskelschwäche), die in den meisten Fällen zu Fütterungsproblemen führt. Im Alter von zwei bis drei Jahren entwickeln sie eine Hyperphagie (zwanghafte Esslust) und sind adipös (übergewichtig). Des Weiteren sind sie kleinwüchsig, haben auffallend kleine Hände und Füße und unterentwickelte Gonaden (Hypogonadismus). Weitere Kennzeichen sind eine meist moderate mentale Retardierung und Verhaltensprobleme. Mandelförmige Augen, ein dreieckiger Mund, sowie eine schmale Stirn gehören ebenfalls zu den charakteristischen Merkmalen eines Patienten mit PWS. Das Prader-Willi-Syndrom wurde erstmals 1956 von A. Prader, A. Labhard und H. Willi beschrieben (Prader *et al.*, 1956) und kommt mit einer Häufigkeit von 1/15000 bis 1/20000 vor. Aufgrund der Symptomatik wird ein Defekt im Hypothalamus vermutet. Bei einigen PWS-Patienten wurde eine verminderte Wachstumshormonausschüttung festgestellt (Lee *et al.*, 1987). Behandlungen mit Wachstumshormonen führten nicht nur zu einer Steigerung der Wachstumsrate, sondern auch zu einer Umwandlung von Körperfett zu Muskelmasse aufgrund der anabolen Wirkung des Medikaments sowie zu einer damit verbundenen Steigerung des Selbstwertgefühls der Patienten mit PWS (Angulo *et al.*, 1992; Kamel *et al.*, 1995; Eiholzer *et al.*, 2000; Tauber *et al.*, 2000).

Patienten mit Angelman-Syndrom zeigen eine verzögerte Entwicklung, eine schwere mentale Retardierung und eine Ataxie. In der Regel entwickeln sie keine aktive Sprache. Weitere Symptome sind eine Mikrozephalie, ein spezifisches abnormales Elektroenzephalogramm (EEG) und Krampfanfälle (Williams *et al.*, 1995). Sie haben außerdem ein ausgeprägt freundliches Wesen und häufig Lachanfalle, weshalb dieses Syndrom auch „happy puppet syndrome“ genannt wurde. Das Angelman-Syndrom hat eine Inzidenz von etwa 1/20000 und wurde das erste Mal 1965 beschrieben (Angelman, 1965).

Prader-Willi-Syndrom**Angelman-Syndrom**

Abb. 1.2: Patientin mit einem Prader-Willi-Syndrom (links) und Patient mit einem Angelman-Syndrom (rechts).

1.2.1 Die PWS- und AS-Region

Durch cytogenetische Untersuchungen fiel bei einigen Patienten mit PWS eine *de novo* Deletion auf dem langen Arm des Chromosoms 15 (15q11-q13) auf (Ledbetter *et al.*, 1981; Ledbetter *et al.*, 1982). Nur wenige Jahre später konnte auch bei Patienten mit AS eine *de novo* Deletion der gleichen Region festgestellt werden (Kaplan *et al.*, 1987; Magenis *et al.*, 1987; Pembrey *et al.*, 1988). Während die Deletion bei Patienten mit PWS immer das paternale Chromosom betraf (Butler und Palmer, 1983; Butler *et al.*, 1986), war sie bei Patienten mit AS immer auf dem maternalen Chromosom zu finden (Knoll *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1990).

In der 4-5 Mb großen Region in 15q11-q13 wurden verschiedene paternal exprimierte Gene identifiziert (in der Abb. 1.3 blau dargestellt). Am weitesten proximal gelegen ist das intronlose Gen *MAKORIN3* (*MKRN3*, früher *ZNF127*), welches für ein DNA-bindendes Zinkfingerprotein kodiert (Jong *et al.*, 1999a; Nicholls, 1993) und ubiquitär von centromer nach telomer exprimiert wird. Etwa 160 kb weiter telomerisch liegt das ebenfalls intronlose Gen *MAGEL2* (*melanoma antigen gene expression like 2*), das nahezu ausschließlich im

Gehirn exprimiert wird (Boccaccio *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000). *MAGEL2* gehört zu der Gruppe der MAGE Proteine, von denen bislang 55 Gene identifiziert wurden (Chomez *et al.*, 2001). Die Autoren postulierten, dass der Verlust der *MAGEL2*-Expression zu Fehlbildungen des Gehirns und zu Dysmorphien bei PWS-Patienten führen könnte. Das Gen *NDN* (*NECDIN-encoding gene*) gehört ebenfalls in die Gruppe der MAGE Proteine, ist etwa 41 kb distal von *MAGEL2* lokalisiert und wird beim Menschen in vielen Geweben exprimiert (Jay *et al.*, 1997; MacDonald und Wevrick, 1997). Bei der Maus wird das homologe Gen *Ndn* spezifisch in postmitotischen Neuronen vor allem im Hypothalamus und anderen Hirnregionen exprimiert (Uetsuki *et al.*, 1996; Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.*, 2000). Das Genprodukt NECDIN verursacht hier einen Arrest des Zellwachstums der Neuronen (Hayashi *et al.*, 1995).

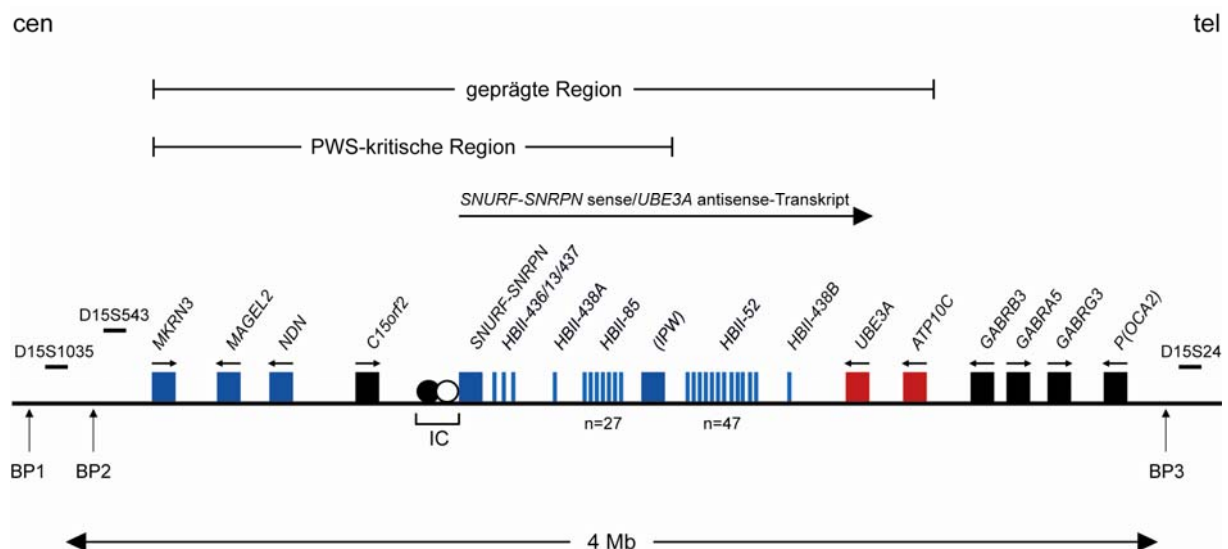


Abb. 1.3: Gensequenzen in der PWS- und AS-Region in 15q11-q13. Paternale exprimierte Gene in der 4 Mb großen Region zwischen den Bruchpunkten (BP1, BP2 und BP3) sind als blaue Boxen und snoRNA-Gene als blaue Striche dargestellt. Die Anzahl ihrer Kopien ist unterhalb der snoRNA-Gene angegeben. Maternal exprimierte Gene sind rot und biallelisch exprimierte Gene sind schwarz dargestellt. Die Transkriptionsrichtung wird durch Pfeile oberhalb der Gene angezeigt und geht entweder in Richtung des Centromers (cen) oder des Telomers (tel). Die beiden Kreise stellen das IC dar. Der proximale Bereich (schwarzer Kreis) ist für die Etablierung des maternalen Imprints und der distale Bereich (weißer Kreis) für die Etablierung des paternalen Imprints notwendig.

Das *SNURF-SNRPN*-Gen wurde 1992 von Özcelik *et al.* in die PWS- und AS-Region kartiert. Das ursprünglich beschriebene Gen hatte 10 Exons, die für zwei unabhängige Proteine kodieren. Die Exons 1-3 von *SNURF-SNRPN* enthalten die Sequenzinformation für das aus 71 Aminosäuren bestehende Protein SNURF (*SNRPN upstream reading frame*), das im Nukleus lokalisiert ist und RNA binden kann (Gray *et al.*, 1999a). Die Funktion dieses

Proteins ist noch weitgehend unbekannt. Das zweite Protein SmN ist das Genprodukt der Exons 4-10 (*SNRPN*). Es ist Teil des Spleißosomen-Komplexes und ist hier assoziiert mit kurzen RNA-Abschnitten und daran gebundenen Proteinen, den „*small nuclear ribonucleoprotein particles*“. Es spielt eine Rolle beim Spleißen von mRNA im Gehirn, wo es das konstitutiv exprimierte SmB'/B-Protein ersetzt (Gray *et al.*, 1999b). In den letzten Jahren konnten alternative Transkripte identifiziert werden, die proximal von *SNURF-SNRPN* alternative Exons enthalten und auf Exon 2 von *SNURF-SNRPN* gespleißt werden (Dittrich *et al.*, 1996; Färber *et al.*, 1999). Für diese alternativen Transkripte konnten zwei unterschiedliche Startpositionen nachgewiesen werden, u1A und u1B. Diese Transkripte überspannen das IC, jedoch ist ihre Funktion unbekannt. Es konnten ebenfalls alternativ gespleißte Transkripte identifiziert werden, die nicht kodierende 3'-Exons enthalten (10a-155). Diese Transkripte spannen einen genomischen Bereich von etwa 500 kb und überlappen mit dem *UBE3A*-Gen in „antisense“-Orientierung (Buiting *et al.*, 1996; Wirth *et al.*, 2001; Runte *et al.*, 2001a; Runte *et al.*, 2004). Dieses *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense-Transkript wurde sowohl in der Maus, als auch beim Menschen identifiziert (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 2001). Interessanterweise sind die *IPW*-Exons Bestandteil dieser komplexen *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense-Transkriptionseinheit und repräsentieren nicht, wie vorher vermutet, ein unabhängiges nicht kodierendes Gen (Wevrick *et al.*, 1994).

Die *SNURF-SNRPN*-Transkriptionseinheit dient als Wirtsgen für verschiedene Gene, die für kleine nukleoläre RNAs (*small nucleolar RNAs*, snoRNAs) kodieren (Cavaillé *et al.*, 2000; Runte *et al.*, 2001a). Diese snoRNAs liegen in den Introns dieser Transkripte. Sie kommen entweder einzeln (*HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A* und *HBII-438B*) oder als Multigen-Cluster vor (*HBII-85* und *HBII-52*). Das *HBII-85*-Cluster besteht aus 27 Genkopien und das *HBII-52*-Cluster weiter distal aus 47 Kopien. SnoRNAs sind kleine, metabolisch stabile RNAs, die bei der posttranskriptionalen Modifizierung von Nukleotiden ribosomaler RNA (rRNA) eine Rolle spielen. Aber auch eine Beteiligung bei der Modifikation von so genannten „*spliceosomal small nuclear*“ RNAs (snRNAs) konnte gezeigt werden. SnoRNA-Gene liegen in der Regel in Introns von Haushaltsgenen (Smith und Steitz, 1998; Pelczar und Filipowicz, 1998) und werden durch den Spleißprozess freigesetzt und aktiviert (Fragapane *et al.*, 1993; Tycowski *et al.*, 1993; Maxwell und Fournier, 1995; Cavaillé und Bachellerie, 1996). Aufgrund ihrer Sequenzmotive werden sie in zwei Gruppen unterteilt: C/D-Box snoRNAs und H/ACA-Box snoRNAs. Durch Bildung spezifischer Basenpaarungen, die das zu modifizierende rRNA-Nukleotid spannen, vermitteln C/D-Box snoRNAs eine

2'-O-Ribose-Methylierung und H/ACA snoRNAs eine Pseudouridylierung (Kiss-Laszlo *et al.*, 1996; Bachellerie und Cavaillé, 1997; Ganot *et al.*, 1997; Smith und Steitz, 1998). Trotz hoher Konservierung ist die Funktion dieser Modifizierungen bisher weitgehend unbekannt. Bei den snoRNA-Genen in der PWS- und AS-Region handelt es sich um C/D-Box snoRNAs mit charakteristischen Sequenzmotiven (C-, C'-, D'- und D-Boxen) und spezifischen Strukturmotiven (*short inverted repeats* am 5'- und 3'- Ende). Das snoRNA-Gen *HBII-437* enthält jedoch eine degenerierte D-Box. *HBII-438A* und *HBII-438B* sind identisch und vermutlich durch Duplikation entstanden. In der Region 15q11-q13 werden die snoRNAs ausschließlich vom paternalen Allel exprimiert. Während das *HBII-52* snoRNA-Gencluster gehirnspezifisch exprimiert wird, kann die RNA der anderen snoRNA-Gene auch in anderen Geweben nachgewiesen werden. Da keine Komplementarität dieser snoRNAs zu rRNA besteht, wird bei ihnen eine andere Funktion vermutet.

Distal von der PWS-kritischen Region wurde das Gen für die E6-AP Ubiquitin Protein Ligase 3A (*UBE3A*) identifiziert (Sutcliffe *et al.*, 1997). Es kodiert für ein Enzym, das Proteine mit Ubiquitin markiert und somit der Degradierung durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zuführt (Scheffner *et al.*, 1995). In bestimmten Gehirnbereichen wird *UBE3A*, sowohl beim Menschen als auch bei der Maus ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert (Rougeulle *et al.*, 1997; Vu und Hoffmann, 1997; Albrecht *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass die geprägte Expression durch das *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense-Transkript reguliert wird, das am IC startet (siehe Abb. 1.3).

Bezüglich der Expression in Fibroblasten und Lymphoblasten gibt es gegensätzliche Beobachtungen. Während Sutcliffe *et al.* (1997) eine biallelische Expression des *UBE3A*-Gens beschreiben, zeigen RNA-FISH-Analysen Hinweise auf eine präferentiell maternale Expression von *UBE3A* in Fibroblasten, Lymphoblasten und neuronalen Vorläuferzellen (Herzing *et al.*, 2002). Zudem wurde sowohl beim Menschen als auch in der Maus ein nicht-gespleißtes, paternal exprimiertes *antisense*-Transkript des *UBE3A*-Gens identifiziert (Rougeulle *et al.*, 1998; Chamberlain *et al.*, 2001). Weiter distal (200 kb) von *UBE3A* befindet das Gen *ATP10C*, das im Gehirn ebenfalls ausschließlich vom maternalen Allel exprimiert wird (Meguro *et al.*, 2001a; Herzing *et al.*, 2001). Es kodiert für ein putatives Protein homolog zu der murinen Aminophospholipid-transportierenden ATPase *Atp10c*. Beide maternal exprimierten Gene sind in der Abbildung 1.2 rot dargestellt.

Mit Ausnahme der snoRNA-Gene weisen die paternal exprimierten Gene in der PWS- und AS-Region eine differentiell methylierte Region in ihrem 5'-Bereich auf, die für die

Regulation der paternalen Gene zuständig ist. Während diese Regionen auf dem paternalen Allel unmethyliert vorliegen und die paternalen Gene exprimiert werden, führt die Methylierung auf dem maternalen Allel zur Stilllegung der paternal exprimierten Gene. Eine Ausnahme bilden hier die maternal exprimierten Gene *UBE3A* und *ATP10C*. Für diese Gene wurde bisher keine differentielle Methylierung beschrieben.

Die *de novo* Deletionen betreffen auch Gene, die nicht dem Imprinting unterliegen (in der Abb. 1.3 schwarz dargestellt). Zwischen *NDN* und *SNURF-SNRPN* befindet sich das intronlose Gen *C15orf2*, das ausschließlich in Testis exprimiert wird (Färber *et al.*, 2000). Im distalen Bereich liegen die GABA-Rezeptor-Gene *GABRB3*, *GABRA5* und *GABRG3*, deren Verlust mit einer Modifizierung des AS-Phänotyps diskutiert wird (DeLorey *et al.*, 1998) und das P-Gen (*pink-eyed dilution*-Gen), welches mit Oculocutanem Albinismus Typ 2 (OCA2) assoziiert ist. Der Verlust einer Genkopie führt bei Patienten mit AS und PWS und einer Deletion von 15q11-q13 zu einer Hypopigmentierung (Spritz *et al.*, 1997).

1.2.2 Molekulargenetische Ursachen des PWS und AS

Die betroffenen Gene für PWS und AS liegen eng benachbart auf Chromosom 15 und unterliegen dem genomischen Imprinting. Obwohl die beiden Syndrome so unterschiedliche Merkmale aufweisen, ist mit rund 70% eine interstitielle *de novo* Deletion der gesamten chromosomalen Region 15q11-q13 die häufigste Ursache für beide Erkrankungen (Butler *et al.*, 1990; Knoll *et al.*, 1990; Saitoh *et al.*, 1994; Jiang *et al.*, 1999). Die Deletionen betreffen zwar denselben chromosomalen Bereich, sind aber unterschiedlicher elterlicher Herkunft. Während bei Patienten mit PWS die Deletion auf dem paternalen Allel liegt (Butler und Palmer, 1983; Butler *et al.*, 1986), ist sie bei Patienten mit AS maternal (Knoll *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1990). Die Deletionsbruchpunkte kommen in zwei Regionen geclustert vor (*breakpoint cluster regions*, BP). Zwei Bruchpunktcluster (BP 1 und BP 2) befinden sich im centromeren Bereich von 15q11-q13 proximal des Markers *D15S1035* bzw. proximal des Markers *D15S543*. Ein weiterer Bruchpunktcluster (BP 3) befindet sich im telomerischen Bereich distal des P-Gens und dem Marker *D15S24* (BP3) (Christian *et al.*, 1995; Christian *et al.*, 1999; Chai *et al.*, 2003) (siehe Abb. 1.3). Der Grund für diese Chromosomenbrüche wird in den duplizierten Sequenzabschnitten vermutet, die in dieser Region identifiziert werden konnten, welche in der Meiose zu fehlerhaften Rekombinationen führen können (Buiting *et al.*, 1992; Buiting *et al.*, 1998a; Ji *et al.*, 1999; Amos-Landgraf *et al.*, 1999; Christian *et al.*, 1999).

Eine weitere molekulargenetische Ursache für PWS und AS ist das Vorhandensein von zwei Chromosomen 15 gleicher elterlicher Herkunft, eine uniparentale Disomie (UPD). Bei 29% der Patienten mit PWS liegt eine maternale UPD (zwei maternale Chromosomen 15) vor (Nicholls *et al.*, 1989; Mascari *et al.*, 1992), das zum Funktionsverlust paternal exprimierter Gene führt. Während in nur 1-3% von Patienten mit AS eine paternale UPD (zwei paternale Chromosomen 15) vorliegt (Malcolm *et al.*, 1991; Knoll *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1999). In diesem Fall kommt es zum Funktionsverlust maternal exprimierter Gene. Eine UPD entsteht als Folge einer Chromosomen-Fehlverteilung (*non-disjunction*) in der Meiose während der Keimzellbildung (siehe Abb. 1.4). Das Risiko für eine UPD nimmt mit steigendem Alter der Mutter zu (Robinson, 2000; Mascari *et al.*, 1992). Bei der Befruchtung einer disomen Keimzelle entsteht eine trisome Zygote. Aufgrund eines Reparaturvorganges, dem „*trisomy rescue*“ geht eines der Chromosomen verloren. Stammt dieses Chromosom aus der disomen Oozyte, entsteht ein normaler monosomaler Karyotyp. Ist es jedoch das Chromosom aus dem normalen monosomalen Spermium, liegt eine uniparentale Disomie vor (Engel, 1993). Fand die Fehlverteilung in der Meiose I statt, liegen zwei heterozygote uniparentale Chromosomen vor (Heterodisomie). Bei einer Fehlverteilung in der Meiose II liegen zwei identische uniparentale Chromosomen vor (Isodisomie). Letztere kann auch nach einer Befruchtung einer normalen Oozyte mit einem für ein Chromosom nullisomen Spermium entstehen, wenn die Monosomie in der entstandenen Zygote durch eine Duplikation des einzelnen Chromosoms ausgeglichen wird (*monosomy rescue*).

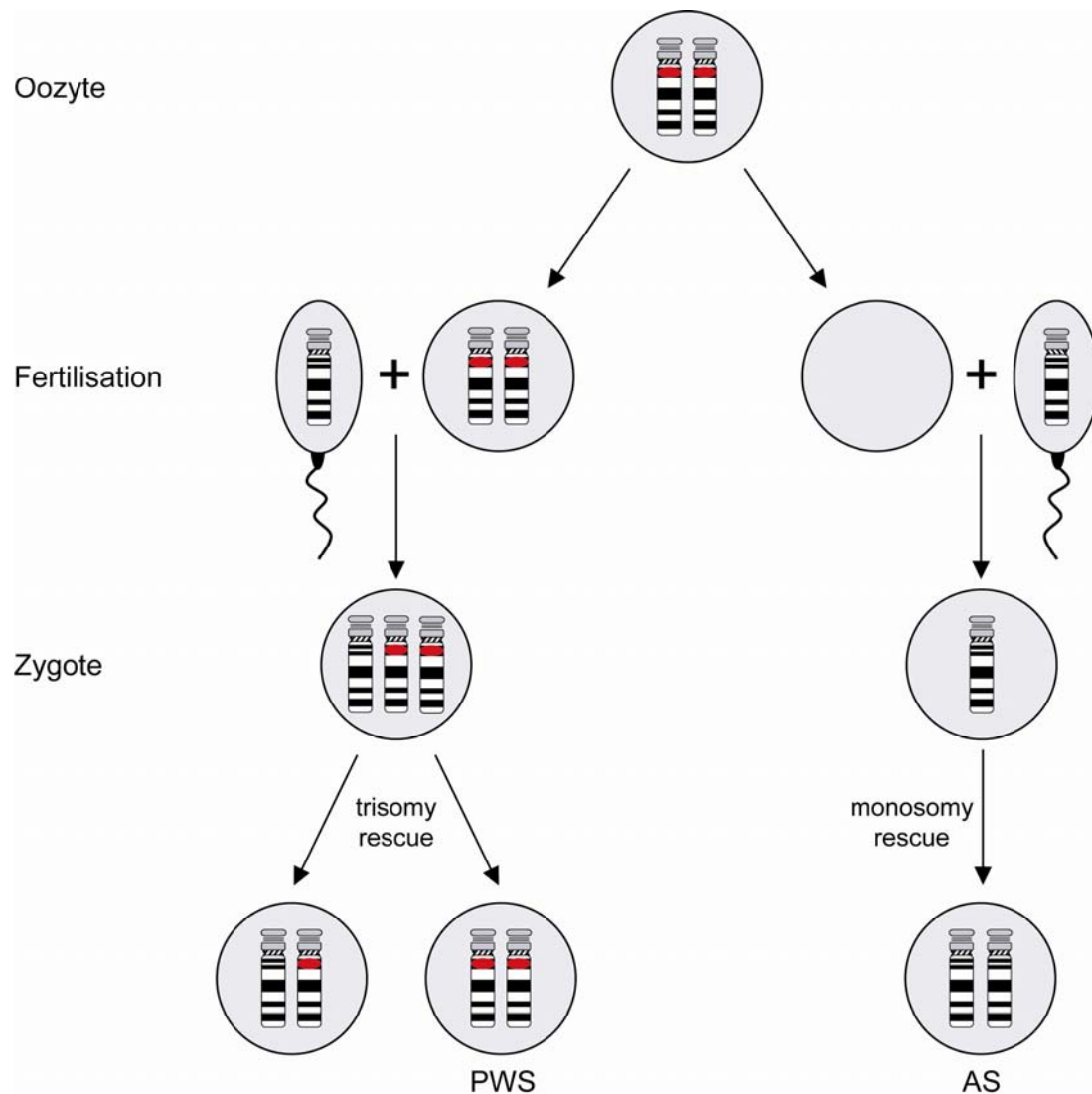


Abb. 1.4: Entstehung einer uniparentalen Disomie in der weiblichen Meiose durch postzygotische Korrekturvorgänge (*trisomy* bzw. *monosomy rescue*). Zur Vereinfachung ist nur ein Chromosomenpaar dargestellt. Das Methylierungs-Imprint in der Region 15q11-q13 ist rot dargestellt.

Einige Patienten mit PWS und AS haben jedoch weder eine Deletion noch eine UPD. Diese Patienten (~1% bei PWS und ~4% bei AS) haben einen Imprinting-Defekt (ID). D.h. sie haben zwei Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, zeigen aber für die gesamte geprägte Region eine uniparentale Methylierung und Genexpression (Glenn *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1994; Sutcliffe *et al.*, 1994; Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996; Bürger *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; Buiting *et al.*, 1998b; Runte *et al.*, 2001b). Bei den Patienten mit PWS trägt das väterliche Chromosom eine maternale Prägung, während bei Patienten mit AS das mütterliche Chromosom eine paternale Prägung aufweist. In etwa 10% der Patienten mit einem Imprinting-Defekt konnte eine Mikrodeletion identifiziert werden, die das IC betrifft (Buiting *et al.*, 1995; Saitoh *et al.*, 1996;

Schuffenhauer *et al.*, 1996; Ohta *et al.*, 1999a; Ohta *et al.*, 1999b; Buiting *et al.*, 2000), welches die Imprint-Umschaltung *in cis* reguliert. Das IC hat eine zweigeteilte Struktur (Buiting *et al.*, 1995) (siehe Abb. 1.3) und erstreckt sich bis Exon 1 von *SNURF-SNRPN*. Eine Deletion des proximalen Bereiches des IC (schwarzer Kreis in Abb. 1.3) führt zu AS. Der kleinste überlappende Deletionsbereich (AS *smallest region of deletion overlap*, AS-SRO) ist hier 880 bp groß und befindet sich 35 kb proximal von *SNURF-SNRPN*. Das AS-SRO ist für die Etablierung des mütterlichen Imprints in der weiblichen Keimbahn verantwortlich. Die Deletion der distalen Region des IC führt dagegen zu PWS (Bielinska *et al.*, 2000; El-Maarri *et al.*, 2001). Der kleinste überlappende Deletionsbereich (PWS-SRO) ist in diesem Fall 4.3 kb groß und spannt Exon 1 von *SNURF-SNRPN*. Das PWS-SRO spielt zwar keine Rolle in der Etablierung des väterlichen Imprints in der männlichen Keimbahn, ist aber notwendig für die Aufrechterhaltung des Imprints in den somatischen Zellen. Familiäre IC-Deletionen kommen am häufigsten vor und sind bei AS immer von der Mutter und dem mütterlichen Großvater ererbt, während sie bei PWS immer von dem Vater und der väterlichen Großmutter ererbt sind. In einigen Fällen konnte keine familiäre IC-Deletion nachgewiesen werden. Die IC-Deletion ist demnach in diesen Patienten *de novo* entstanden, oder aber sie ist die Konsequenz eines Keimbahn-Mosaiks (Buiting *et al.*, 2003).

In der Mehrzahl der Patienten mit einem Imprinting-Defekt (85% - 90%) ist die Epimutation ohne vorherige DNA-Sequenz-Veränderung entstanden (primäre Epimutation) (Buiting *et al.*, 2003). Während bei AS-Patienten das Chromosom 15 mit dem Imprinting-Defekt sowohl von der mütterlichen Großmutter als auch vom mütterlichen Großvater vererbt wird, stammt das falsch geprägte Chromosom 15 bei PWS ausschließlich von der väterlichen Großmutter (Buiting *et al.*, 2003). D.h. die epigenetische Prägung von chromosomalen Bereichen wird von einer Generation zur nächsten nicht komplett gelöscht und somit weitervererbt. Man spricht von einer Epigenetischen Vererbung (*epigenetic inheritance*).

Bei 25% aller Patienten mit AS wird eine Mutation im *UBE3A-Gen* vermutet. Bislang konnte das in 10-15% dieser Patienten auch tatsächlich nachgewiesen werden (Kishino *et al.*, 1997; Matsuura *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1999). Liegt die Mutation auf dem mütterlichen Chromosom, wird in den Zellen, die *UBE3A* monoallelisch exprimieren, kein funktionsfähiges Enzym gebildet und es resultiert ein AS. In den restlichen 10% konnte keine der bisher genannten Ursachen festgestellt werden. Da bei PWS bislang keine Mutation in einem der paternal exprimierten Genen nachgewiesen wurde, lässt das vermuten, dass PWS durch den Verlust oder die Inaktivierung mehrerer paternal exprimierter Gene entsteht (*contiguous gene syndrome*) (Nicholls *et al.*, 1998).

1.2.3 Mausmodelle für Defekte in der PWS- und AS-Region

Für Defekte in der PWS- und AS-Region sind verschiedene Mausmodelle generiert worden. Die orthologe Region zu 15q11-q13 beim Menschen befindet sich auf Chromosom 7 der Maus. Die homologen ebenfalls geprägten Gene sind ähnlich angeordnet wie beim Menschen (Chaillet *et al.*, 1991). Sowohl eine maternale Duplikation der orthologen Mausregion auf Chromosom 7 (Cattanach *et al.*, 1992), als auch eine paternale Deletion der PWS- und AS-Region durch eine transgene Insertion (Gabriel *et al.*, 1999) resultieren in einem PWS-ähnlichen Phänotyp. Die *Knock-out* Maus für das *MKRN3*-Homolog *Zfp127* ist lebensfähig, fertil und nicht fettleibig (Jong *et al.*, 1999b). Während ein Mausstamm mit einer paternalen Deletion von *Necdin* keine Auffälligkeiten zeigte (Tsai *et al.*, 1999b), resultierte eine ähnliche Deletion in anderen Mausstämmen in postnataler Letalität, die vermutlich durch respiratorische Probleme verursacht wird (Gerard *et al.*, 1999; Muscatelli *et al.*, 2000). Mäuse mit einer Deletion von *Snurf-Snrpn* Exon 2 (Tsai *et al.*, 1999a) und Mäuse mit einer Nullmutation für SmN (Yang *et al.*, 1998) zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Auch bei der Maus wird die gesamte Region durch ein IC reguliert, was durch eine heterozygote *Knock-Out* Maus, bei der die Exons 1-6 des *Snurf-Snrpn*-Gens sowie das putative PWS-IC deletiert waren, gezeigt werden konnte. Dadurch kam es zum Expressionsverlust von *mkrn3*, *Ndn* und *Ipw* und zu einem PWS-Phänotyp (Yang *et al.*, 1998). Mäuse mit einer paternalen Deletion der Region von *Snurf-Snrpn* bis *Ube3a* zeigen ebenfalls einen PWS-ähnlichen Phänotyp. Sie sind klein, hypoton und sterben bald nach der Geburt (Tsai *et al.*, 1999a; Chamberlain *et al.*, 2004). Hingegen führt eine Deletion der Region von *Ipw* bis einschließlich *Ube3a* zu keinem auffälligen Phänotyp (Nicholls, 1999; Goss *et al.*, nicht publiziert; Tsai *et al.*, 1999a; Ding *et al.*, 2005). Einen AS-ähnlichen Phänotyp konnte man bei Mäusen mit einem *Ube3a*-Nullallel auf dem maternalen Chromosom beobachten (Jiang *et al.*, 1998). Diese Tiere waren fertil und zeigten Verhaltensauffälligkeiten wie z.B. Defizite in Motorik und Koordination, Lernschwierigkeiten und Krampfanfälle. Auch eine partielle paternale UPD des Mauschromosom 7 führt zu einem AS-ähnlichen Phänotyp (Cattanach *et al.*, 1997). Maternale Deletionen des Gens *Atp10c* führen bei Mäusen zu einer Zunahme des Körperfetts (Dhar *et al.*, 2000).

1.3 Zielsetzung

Für die molekulargenetische Diagnostik bei Patienten mit PWS und AS nutzt man die elternspezifische (differentielle) Methylierung im Promoterbereich und Exon 1 des *SNURF-SNRPN*-Gens. Bei Patienten mit einem AS, die entweder eine große *de novo* Deletion des chromosomalen Bereichs 15q11-q13, eine paternale UPD oder einen Imprinting-Defekt haben, sieht man in der methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR, Zeschnigk *et al.*, 1997) ein für AS typisches Methylierungsmuster: die Anwesenheit der unmethylierten paternalen Bande und das Fehlen einer methylierten maternalen Bande. Bei einigen Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt ohne IC-Deletion fiel jedoch eine schwache maternale Bande auf, was auf einen Methylierungs-Mosaik deutet. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bei diesen Patienten tatsächlich ein somatisches Mosaik vorliegt und wenn ja, sollte der Anteil der normal methylierten Zellen bestimmt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der Grad des Mosaiks mit der Schwere des Phänotyps korreliert und zudem der Zeitpunkt der ID-Entstehung näher eingegrenzt werden.

Zwei Mausmodelle mit unterschiedlichen, überlappenden Deletionen der Region zwischen *SNURF-SNRPN* und *UBE3A* weisen darauf hin, dass die snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A* und das snoRNA-Gencluster *HBII-85*, die in dieser Region liegen, mögliche Kandidatengene für Teilaspekte des PWS-Phänotyps sind. Eine Analyse von Patienten mit PWS, die nur Teilaspekte des PWS Phänotyps aufweisen, soll Aufschluss darüber geben, inwiefern strukturelle Veränderungen oder Deletionen in diesen snoRNA Genen zur phänotypischen Ausprägung des PWS beitragen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Boehringer Mannheim (Mannheim), Merck (Darmstadt), Sigma (Heidelberg), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe) und GibcoBRL (Eggenstein) in *pro analysis* Qualität bezogen. Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

2.1.2 Standardlösungen und Medien

Standardlösungen:

10x Ladepuffer:	0.25% Bromphenolblau oder Xylenblau, 15% Ficoll, 10 mM EDTA
PBS:	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄
SSC:	150 mM NaCl, 15 mM Na ₃ -Citrat
TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA
TE:	10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA
NaCl/EDTA-Lösung:	75 mM NaCl, 24 mM EDTA

Standardmedien:

LB-Medium:	1% Trypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl
LB-Platten:	LB-Medium, 1.2% Bacto-Agar (Difco), 100 µg/ml Ampicillin, 16 µg/ml X-Gal

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, GibcoBRL und Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

Weitere Enzyme

<i>AmpliTaq</i> [®] -Polymerase	(Perkin Elmer, Heidelberg)
DNA-Polymerase I, Klenow-Fragment	(Boehringer Mannheim)
Proteinase K	(Boehringer Mannheim)

T ₄ -DNA-Ligase	(Boehringer Mannheim, Promega Mannheim)
Advatage-HF 2 Polymerase Mix	(Clontech)
Ribonuklease A	(Boehringer Mannheim)
Ribonuklease T ₁	(Boehringer Mannheim)

2.1.4 Vektoren

PGEM[®] -T Easy (Promega)

2.1.5 Bakterienstämme

E.coli DH5 α : endA1, hsdR17, supE44, thi-1, λ^- , recA, gyrA96, relA1

2.1.6 Klone

Der genomische Klon 132D4 (Brownstein *et al.*, 1989) enthält den Marker *D15S10* und wurde über das *RessourcenZentrum/Primär Datenbank* (RZPD), Berlin, bezogen. Das 600 kb große Insert wurde an der Klonierungsstelle für *EcoRI* in den pYAC4-Vektor kloniert.

2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide oder Primer, die nicht bereits im Institut etabliert waren, wurden mit dem Programm Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) ausgesucht.

2.1.7.1 Oligonukleotide für die X-Inaktivierungs-Untersuchung

Für die X-Inaktivierungs-Untersuchung wurden die Primer in der Tabelle 2.1 verwendet (Fu *et al.*, 1991).

Tabelle 2.1: Primer für die X-Inaktivierungs-Untersuchung.

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' Orientierung)
CGG-F	GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT
CGG-R	(6FAM)-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA

2.1.7.2 Oligonukleotide für die Klonierung von Bisulfit-DNA

Mit den in Tabelle 2.2 genannten Oligonukleotiden (El-Maarri *et al.*, 2001) wurden PCRs in der SNRPN Promoterregion durchgeführt. Die erste PCR wurde bei einer Annealing-Temperatur von 67°C durchgeführt und die Nested-PCR bei 62°C.

Tabelle 2.2: Primer für die Klonierung von Bisulfit-DNA.

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' Orientierung)
BISNP-F1	TCC AAA ACA AAA AAC TTT AAA ACC CAA ATT C
BISNP-R1	AGG TTT TTT TTT ATT GTA ATA GTG TTG TGG GG
BISNP-F2	TCA ATA CTC CAA ATC CTA AAA ACT TAA AAT ATC
BISNP-R2	TGT GGG GTT TTA GGG GTT TAG TAG TTT TTT TTT TTT AGG

2.1.7.3 Hybridisierungssonden

Die 3 kb große cDNA-Sonde IPWE4E3 wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* aus dem Klon IPWE4.2 ausgeschnitten. Die 353 bp große Sonde *D15S1542* wurde mit den Primern NG89 und NG90 (siehe Tabelle 2.3) aus genomischer DNA amplifiziert. Eine dritte 196 bp große Sonde wurde mit den Primern NG79 und NG80 amplifiziert. Die Primer und die Sequenz der durch sie amplifizierten PCR-Produkte wurde mit Hilfe des Blast-Programms von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nach homologen Bereichen in anderen chromosomalen Regionen analysiert, um Kreuzhybridisierungen zu vermeiden.

Tabelle 2.3: Spezifische Oligonukleotide für Hybridisierungssonden.

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' Orientierung)
NG79	GTG CTT GTT TGG ATC GAT GA
NG80	GCC CTC TTC GGA GAG ATA G
NG89	GGC CTG AGG TCA GAG TTC AC
NG90	ATA CCC ATG CCA TTC TGT GG

2.1.8 Patienten

2.1.8.1 Patienten mit AS und einem atypischen Methylierungsmuster

Die klinische Diagnose bei den einzelnen Patienten wurde von verschiedenen Human-Genetikern gestellt. Bei allen Patienten konnte molekulargenetisch eine große Deletion und eine UPD ausgeschlossen und ein Imprinting-Defekt ohne IC-Deletion bestätigt werden. Eine

methylierungsspezifische PCR (MS-PCR; Zeschnigk *et al.*, 1997) bei diesen Patienten zeigte jedoch ein auffälliges Muster am *SNURF-SNRPN*-Locus. Anstelle eines AS-typischen Methylierungsmusters mit einer einzelnen paternalen Bande, zeigten diese Patienten eine zusätzliche schwache maternale Bande.

2.1.8.2 Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp bzw. Teilsymptomen für PWS

Eine Anzahl von Patienten, die uns mit der Verdachtsdiagnose PWS zur molekulargenetischen Diagnostik zugesandt wurden, zeigten einen PWS-ähnlichen Phänotyp oder eine mentale Retardierung in Verbindung mit Übergewicht bzw. bestimmte Teilsymptome für PWS, wie (geringes Geburtsgewicht (< -2 Standardabweichung) oder Kleinwuchs). Mittels molekulargenetischer Untersuchungen konnte die Verdachtsdiagnose PWS nicht bestätigt werden. Maus-Daten geben Hinweise darauf, dass snoRNA-Gene zwischen *Snurf-Snrpn* und den *Ipw*-Exons für einen PWS-ähnlichen Phänotyp verantwortlich sein könnten (Tsai *et al.*, 1999; Chamberlain *et al.*, 2004). Daher wurden vier Patienten-Kollektive mit unterschiedlichen Methoden auf Deletionen von snoRNAs untersucht. Das waren: 14 Patienten mit einem PWS-ähnlichen Phänotyp, 90 konsekutive Patienten mit Verdacht auf PWS, die in der MS-PCR eine normale Methylierung zeigten und mental retardiert und übergewichtig sind, 33 ebenfalls konsekutive Patienten mit Verdacht auf PWS, einer normalen Methylierung, mentaler Retardierung, Übergewicht und zusätzlich einem geringen Geburtsgewicht (< -2 Standardabweichung) und 146 Patienten mit einer konstitutionellen Entwicklungsverzögerung (Kleinwuchs).

Die DNA der Patienten mit Kleinwuchs wurde uns von Dipl.-Math. Astrid Dempfle vom Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie zur Verfügung gestellt. Die Diagnose wurde eingeteilt nach der Knochenalterretardierung (>1 Jahr = Konstitutionelle Entwicklungsverzögerung (KEV)) und der elterlichen Größe (Zielgrößenbereich des Kindes, ermittelt aus elterlicher Durchschnittsgröße, liegt unter der 5. Perzentile = familiärer Kleinwuchs). Von den 150 Patienten haben etwa 10% einen idiopathischen Kleinwuchs (Knochenalterretardierung weniger als 1 Jahr und elterliche Größe im Normbereich), ca. 35% eine Knochenalterretardierung (KEV), ca. 10% einen reinen familiären Kleinwuchs und gut 40% sowohl KEV als auch familiären Kleinwuchs (persönliche Mitteilung von Frau Dempfle und Wudy *et al.*, 2005).

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von DNA aus peripherem Blut

Zur Präparation von genomischer DNA aus Blut wurden zwei unterschiedliche Methoden von der Firma Qiagen verwendet. War genug Blut vorhanden (1-3 ml) und wurde eine größere Menge von DNA benötigt, wurde die FlexiGene-Methode (2.2.1.1) angewandt. Die andere Alternative war die automatisierte Präparation mit dem BioRobot EZ1 Workstation. Hierfür reichten kleinere Mengen von Blut (200-350 µl) aus (2.2.1.2).

2.2.1.1 DNA-Präparation mit FlexiGene

Zu 7.5 ml FG1-Puffer wurden 3 ml EDTA-Blut, das entweder frisch abgenommen oder bereits bei -20°C lagerte gegeben und fünfmal invertiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert (5 min 2000 x g) und der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 1.5 ml mit Protease versetzter FG2-Puffer gegeben. Das Pellet wurde auf dem Vortexer homogenisiert, der Ansatz dreimal invertiert und 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Zur anschließenden Fällung der DNA wurden 1.5 ml 100% Isopropanol zugegeben. Durch mehrmaliges Invertieren wurde die DNA präzipitiert und der Ansatz für 3 min bei 2000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1.5 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 2000 x g, wurde der Überstand verworfen, das Pellet 5 min an der Luft getrocknet und in 300 µl FG3-Puffer 1 h im 65°C-Heizblock und anschließend bei RT über Nacht auf dem Roller gelöst.

2.2.1.2 DNA-Präparation mit dem BioRobot EZ1 Workstation

Die Präparation von DNA mit dem BioRobot EZ1 von Qiagen funktioniert vollautomatisch und nach dem Prinzip der magnetischen Trennung. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden kurz zusammengefasst: Die Zellen werden mit Proteinase K aufgeschlossen und mit magnetischen Partikeln gemischt, an die die DNA bindet. Durch ein magnetisches Feld werden die Partikel mit der DNA von dem Rest abgetrennt. Nach einem Waschschrift wird das magnetische Feld abgestellt und die DNA eluiert.

2.2.2 Isolierung von DNA aus Fibroblasten

Die mittels Trypsin/EDTA gelösten und in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführten Zellen (2.2.15) wurden 5 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Fibroblasten wurden mit 1 ml NaCl/EDTA gewaschen und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen, die Zellen in 500 µl NaCl/EDTA, 5 µl 10% SDS und 10 µl Proteinase K aufgenommen, kurz auf dem Vortexer gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 250 µl kaltes Chloroform mit Isoamylalkohol (96%, 4%) und 250 µl Phenol dazupipettiert, der Ansatz durch fünfmaliges Invertieren vorsichtig gemischt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die oberste Schicht mit der DNA wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Nachdem dieser Schritt noch einmal wiederholt wurde, wurden 500 µl Chloroform mit Isoamylalkohol dazupipettiert, der Ansatz vorsichtig gemischt und 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes wurde der Überstand zur Fällung der DNA mit 50 µl NaOAc und 1 ml absolutem Ethanol versetzt. Mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette wurde die DNA aus dem Ansatz gefischt, in 70% Ethanol gewaschen, 15 min an der Luft getrocknet und in 100 µl TE gelöst.

2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Vermehrung der Bakterien erfolgte im LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und wurde über Nacht im Schüttelinkubator (New Brunswick Scientific G26) bei 37°C und 275 rpm inkubiert. Die Präparation erfolgte bis auf wenige Modifikationen nach dem Protokoll der Firma Qiagen, das auf der Alkali-Lyse-Methode von Birnboim und Doly (1979) beruht. Die Zusammensetzung der Puffer 1-3 ist in den Präparationsprotokollen für die analytische Präparation und die Präparation im großen Maßstab identisch.

Für die analytische Präparation wurde eine Bakterienkolonie über Nacht in 5 ml Medium inkubiert. 1.5 ml der Übernachtskultur (ÜNK) wurden 5 min bei 15000 g zentrifugiert und das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 300 µl Puffer 3 (3 M KOAc pH 5.5) zugegeben und 15 min bei 11500 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 500 µl Ethanol hinzu gegeben und die DNA durch Zentrifugation (25 min bei Raumtemperatur und 11500 g) pelletiert. Das Pellet wurde mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl RNase-Lösung (50 µg/ml RNase A, 20 Units RNase T₁ in H₂O) gelöst und 1 h bei 37°C inkubiert.

Um im großen Maßstab Plasmid-DNA zu gewinnen, wurden 150 ml Medium mit 0.5 ml einer ÜNK angeimpft und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (10 min bei 9950 g und 4°C) und in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Danach wurden 10 ml Puffer 2 zugegeben und der Ansatz 3 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde mit 10 ml

gekühltem Puffer 3 versetzt und 20 min auf Eis gestellt. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation (20 min bei 4°C und 13800 g) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, erneut zentrifugiert (15 min bei 4°C und 13800 g) und auf eine Qiagen 500 Ionenaustauschsäule gegeben, die zuvor mit 10 ml QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol, 0.15% Triton X-100) äquiliert worden ist. Die an das Säulenmaterial gebundene DNA wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% Ethanol) gewaschen und anschließend mit 15 ml QF-Puffer (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 15% Ethanol) eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 10 ml Isopropanol und Zentrifugation (20 min bei 14000 g und RT). Die DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl RNase-Lösung aufgenommen. Abschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C.

2.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Bestimmung der Konzentration wurde die DNA in Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm in dem Spektralphotometer Ultrospec III von Pharmacia gemessen. Die optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die OD₂₆₀-Werte wurden mit dem Faktor 50 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Bei proteinfreier DNA beträgt der Quotient aus der OD₂₆₀ und der OD₂₈₀ etwa 1.8.

Alternativ wurde die DNA-Konzentration durch Auftragung eines Aliquots neben 12 µl λ HindIII-Größenstandard auf einem Agarosegel und anschließendem Vergleich der Intensitäten der Banden abgeschätzt. Dabei entsprach das 23 kb große Fragment des λ HindIII-Größenstandards einer DNA-Menge von 150 ng.

2.2.5 Restriktionsspaltung von DNA

Für die Restriktionsspaltung wurden 2 µg genomische DNA mit 10 bis 20 Units des jeweiligen Restriktionsenzym und dem erforderlichen 1x Restriktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl gemischt. Durch Zugabe von 0.1 µg/µl BSA wurden die Restriktionsenzyme stabilisiert. Die Restriktion genomischer DNA benötigte mindestens 6 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur. Beim Schneiden der DNA durch zwei verschiedene Restriktionsenzyme musste jeweils die optimale Salzkonzentration im Puffer berücksichtigt werden. Zunächst wurde mit dem Enzym geschnitten, das eine niedrigere Salzkonzentration benötigte, anschließend wurde die höhere Salzkonzentration in einem Reaktionsvolumen von 40 µl eingestellt und das zweite Enzym zugegeben.

2.2.6 Bisulfit-Behandlung von DNA

Durch die Bisulfit-Behandlung wird die DNA so verändert, dass in der Sequenz identische methylierte und unmethylierte Allele, voneinander unterschieden werden können (Olek *et al.*, 1996). Dabei werden unmethylierte Cytosin-Reste in CpG-Dinukleotiden (CpGs) durch Uracil und diese in der nachfolgenden methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR, Zeschnigk *et al.*, 1997) durch Thymin ersetzt.

Für die Bisulfit-Behandlung wurden 2 µg DNA mit Wasser auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Zur Denaturierung der DNA wurden 5.5 µl 3 M NaOH dazupipettiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C und 2 min bei 95°C im vorgeheizten Heizblock inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Für die Bisulfit-Lösung wurden 8.5 g Sodium Bisulfit in 15 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 0.9 ml 50 mM Hydrochinon und 1000 µl 10 N NaOH wurde das Volumen mit Wasser auf 20 ml gebracht. Zu der denaturierten DNA wurden 500 µl der Bisulfit-Lösung gegeben und der Ansatz über Nacht bei 50°C im Dunkeln inkubiert.

Für die Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA wurde das Wizard® DNA Clean-Up System von Promega verwendet. Dazu wurde die DNA mit 1 ml Wizard-Lösung gemischt und in einen Kolben pipettiert, der mit einer Säule verbunden und auf eine Vakuum-Apparatur aufgesteckt war. Nachdem das Vakuum angelegt wurde und die Lösung durch die Säule durchgelaufen war, wurde die DNA mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen. Die Säulen wurden weitere 30 sec getrocknet, auf 1.5 ml Reaktionsgefäße gesteckt und 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert, um das überschüssige Isopropanol zu entfernen. Auf die Säule wurden 50 µl auf 65°C-warmes Wasser pipettiert. Nach einer Minute wurden die Säulen auf neue Reaktionsgefäße übertragen und 20 sec bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die Bisulfit-behandelte und aufgereinigte DNA wurde mit 5.5 µl 3 M NaOH 15 min bei 37°C denaturiert. Anschließend wurde sie mit 55 µl 6 M NH₄OAc, 1 µl Glycogen und 350 µl absolutem Ethanol präzipitiert. Nach einer 20 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das durch das Glycogen sichtbare Pellet mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zuletzt wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 30 µl Wasser aufgenommen.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki *et al.*, 1985) wird für die Vervielfältigung (Amplifikation) von spezifischen DNA-Fragmenten eingesetzt. Ausgehend von einer geringen Menge an DNA können hohe Konzentrationen der Ziel-DNA produziert werden. Die Reaktionen wurden mit der thermostabilen *AmpliTaq*[®] DNA Polymerase (Perkin Elmer) in 200 µl Reaktionsgefäßen oder 96-Lochplatten („*Optical Plates*“, Applied Biosystems) durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Komplexität wurden von genomischer DNA ca. 100 ng und von Phagen- und Plasmid-DNA je 1 pg in einer 50 µl-Reaktion eingesetzt. Weiterhin enthielt der Reaktionsansatz 2.5 Units *AmpliTaq*[®] Polymerase, je 4 pmol 5'- und 3'- Primer, je 0.2 mM der dNTPs und 1x Reaktionspuffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCL (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.001% Gelatine). Die Reaktionszeiten waren wie folgt: Nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 95°C folgten 35 Zyklen aus je 15 sec Denaturierung bei 95°C, 30 sec *Annealing* und 30 sec Elongation bei 72°C und anschließend eine verlängerte Syntheseperiode von 7 min bei 72°C, um das Problem der Template-unabhängigen Addition von Nukleotiden zu umgehen (Clark, 1988; Smith *et al.*, 1995). Die *Annealing*-Temperatur richtete sich nach der Zusammensetzung der in einer PCR-Reaktion kombinierten Primer.

2.2.8 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Effizienz und zur Produktmengenabschätzung sowie für die Southern-Blot-Analyse wurden 1 – 2.5% ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer aufgekocht, mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in horizontale Gelkammern unterschiedlicher Größe gegossen. Nach dem Auskühlen wurden von 50 µl umfassenden PCR-Ansätzen jeweils 15 µl aufgetragen. Dazu wurden die Proben mit Ladepuffer gemischt (Endkonzentration 1x) und bei ca. 3 V/cm Elektrodenabstand in 1x TAE-Puffer mit 0.4 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Als Größenstandards dienten die 1 kb-Leiter (Invitrogen), *Msp*I-gespaltene pUC19-DNA (MBI Fermentas) und *Hind*III-geschnittene Lambda-Phagen-DNA (Boehringer). Die Gele wurden auf einem Transilluminator unter UV-Licht (302 nm) begutachtet, mit einem digitalen Fotodokumentationssystem (Herolab) fotografiert und die Fotos auf Thermopapier ausgedruckt.

2.2.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente, die aus einer PCR stammten, wurden für die Sequenzierung und Subklonierung von unspezifischen DNA-Fragmenten, Nukleotiden, Primern, Proteinen und sonstigen Verunreinigungen befreit. Die Aufreinigung erfolgte nach einer der folgenden Methoden.

2.2.9.1 Microcon-Methode

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Volumen der PCR-Reaktion mit Wasser auf 500 µl erhöht und in einen Filtereinsatz eines „Microcon-100 Mikrokonzentrators“ (Amicon) pipettiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 500 g wurde das Eluat, welches Salze, Primer und Nukleotide enthält verworfen. Es wurden erneut 500 µl Wasser auf die Säule pipettiert und nochmals zentrifugiert. Nun wurde der Filtereinsatz umgedreht, in ein neues Gefäß überführt und 2 min bei 500 g zentrifugiert. Danach lagen die DNA-Fragmente in einem Volumen von ca. 10 µl vor.

2.2.9.2 Aufreinigung mit dem MinElute PCR-Purification Kit (Qiagen)

Zur Aufreinigung des PCR-Produkts wurden 5 Volumen Puffer PB dazupipettiert, gemischt und auf die Säule eines „MinElute“-Gefäßes überführt. Zum Binden der DNA an die Säule wurde für 1 min bei 10000 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Anschließend wurde die DNA gewaschen. Dazu wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und für 1 min bei 10000 g zentrifugiert. Um eventuelle Ethanolreste zu entfernen, wurde die Zentrifugation wiederholt. Für die Elution wurde das „MinElute“-Gefäß in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 10 µl Wasser mittig auf die Säule pipettiert. Nach Inkubation von 1 min und abschließender Zentrifugation lag die aufgereinigte DNA in einem Volumen von ca. 10 µl vor.

2.2.9.3 Aufreinigung mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)

Das zu aufreinigende DNA-Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zum Lösen der Agarose wurde 1 Volumen Puffer QG hinzugefügt und es folgte eine Inkubation von 10 min bei 50°C, wobei das Lösen durch mehrmaliges Schütteln auf einem Vortexer erleichtert wurde. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol präzipitiert und der gesamte Ansatz auf die Säule eines „MinElute“-Gefäßes pipettiert. Zum Binden der DNA an die Säule wurde für 1 min bei 10000 g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Nun wurden 500 µl Puffer QG auf

die Säule gegeben und wiederum zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit 750 µl ethanolhaltigem Puffer PE mit anschließender Zentrifugation für 1 min. Zum Entfernen möglicherweise verbliebener Ethanolreste wurde die Zentrifugation wiederholt. Für die Elution wurde das „MinElute“-Gefäß in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 11 µl Wasser mittig auf die Säule pipettiert. Nach einer Inkubation von 1min und abschließender Zentrifugation lag die aufgereinigte DNA in einem Volumen von ca. 10 µl vor.

2.2.10 Realtime-PCR (TaqMan®)

Die Realtime quantitative PCR ermöglicht die Quantifizierung von DNA und RNA PCR-Produkten durch die Detektion eines Fluoreszenzsignals, dessen Zunahme sich proportional zu der Mengenzunahme eines PCR-Produktes verhält (Heid et al., 1996). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur relativen Quantifizierung von methylierten Allelen (2.2.10.1) und zur Detektion von Deletionen (2.2.10.2) mit dem so genannten TaqMan®-System gearbeitet. Hierbei wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Primer-Express“ (Applied Biosystems) Primer mit einer *Annealing*-Temperatur von 58°C in den zu untersuchenden Bereich gelegt. Gleichzeitig bestimmte das Programm eine MGB TaqMan®-Sonde, deren *Annealing*-Temperatur um 10°C höher war als die der PCR-Primer. Die Sonde wurde am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom versehen. Im freien Zustand der Sonde wurde die Fluoreszenzaktivität durch einen Quencher am 3'-Ende der Sonde unterdrückt (Livak et al., 1995). Die PCR wurde im ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die *Taq* Polymerase verlängerte die Primer am 3'OH Ende und degradierte dabei durch ihre intrinsische 5'-3' Nuclease-Aktivität die TaqMan Sonde. Dadurch wurden das Reporter-Fluorochrom und der Quencher räumlich voneinander getrennt, was zur Erzeugung eines Fluoreszenz-Signals führte (Holland et al., 1991). Dieses wurde gemessen und direkt im angeschlossenen Computer verarbeitet. Als Ergebnis erhielt man einen Wert (Schwellenzyklus, C_T), welcher dem PCR-Zykluszahl entsprach, bei der das Fluoreszenz-Signal eine bestimmte Intensitätsschwelle, die über dem Hintergrundrauschen und in der exponentiellen Phase der Reaktion lag, überschritten hatte. Dieser Wert verhielt sich umgekehrt proportional zur Anzahl der eingesetzten Zielmoleküle: je höher die Anzahl der Zielmoleküle, desto niedriger war der C_T -Wert.

Die PCR-Bedingungen waren für jede Realtime-PCR standardisiert. Nach einer anfänglichen Denaturierung von 10 min bei 95°C, bei der die AmpliTaq Gold Polymerase aktiviert wurde, folgten 40 Zyklen mit 15 sec 95°C und 1 min 60°C. Die PCR-Produkte wurden mit dem

ABIprism® 3100 Genetic Analyzer und der *GeneScan*™ Analyse Software sowie dem Programm *Genotyper* (Applied Biosystems) analysiert.

2.2.10.1 Quantitative Analyse von methylierten Allelen mittels Realtime-PCR

Die relative Quantifizierung von methylierten Allelen wurde mit der Realtime-PCR-Methode QAMA (quantification of methylated alleles) mit Bisulfit-behandelter DNA (2.2.6) durchgeführt (Zeschnigk *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur MethyLight PCR (Eads *et al.*, 2000), bei der zwei unabhängige PCRs für das methylierte und das unmethylierte Allel durchgeführt werden müssen, können mit Hilfe von QAMA beide Allele mit der gleichen Effizienz in einem einzelnen Reaktionsgefäß amplifiziert werden.

Bei der Auswahl der Primer (siehe Tabelle 2.4) in der *SNURF-SNRPN* Exon1/Promotor-Region wurde darauf geachtet, dass die Bindestellen keine CpGs enthielten und die Primer an das methylierte und das unmethylierte Allel binden konnten. Um die Allele dennoch voneinander unterscheiden zu können, wurden die Sonden (siehe Tabelle 2.4) für das 238 bp große Fragment so ausgewählt, dass sie vier CpGs spannten und somit spezifisch für das methylierte bzw. das unmethylierte Allel waren. Die Sonde für das methylierte Allel wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und die für das unmethylierte Allel mit VIC markiert. Für die PCR wurden 12.5 µl TaqMan Universal Master Mix (ohne AmpErase, UNG), 2.5 µl Bisulfit-behandelte DNA, 2.5 U AmpliTaq Gold, je 2.5 µM 5'- und 3'-Primer, je 150 nM FAM- und VIC-markierte Sonde und Wasser eingesetzt. Jeder Ansatz wurde zweimal pipettiert, um mögliche Pipettierfehler auszugleichen. Für die Standardkurve wurde vor der Bisulfit-Behandlung die DNA eines Patienten mit PWS und uniparentaler Disomie (zwei methylierte Allele), mit der DNA eines Patienten mit AS und einer Deletion (ein unmethyliertes Allel) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (siehe Tabelle 2.5). Die PCR-Bedingungen waren wie unter 2.2.10 beschrieben.

Aus den beiden C_T -Werten der Doppelbestimmung wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und für jeden Ansatz die Differenz (ΔC_T) zwischen den C_T -Werten beider Sonden berechnet ($\Delta C_T = C_{T-VIC} - C_{T-FAM}$). Die ΔC_T -Werte der Standardkurve wurden gegen die Menge an methylierter DNA in den einzelnen Ansätzen aufgetragen (siehe Abb. 3.4). Die Gleichung der so entstandenen sigmoiden Kurve (Methylierung in % = $100/(2^{-(\Delta C_T - 1.61)/1.26} + 1)$) wurde zur quantitativen Bestimmung der methylierten Allele in den einzelnen Patienten verwendet. Überschritt nur eine Kurve die Intensitätsschwelle, wurde der Wert für diese auf 100% gesetzt.

Tabelle 2.4: Primer und Sonden für die quantitative Analyse von methylierten Allelen mittels Realtime-PCR.

	Name	Sequenz (5' - 3')
Primer	SNRPNqmF	GAG GGA GTT GGG ATT TTT GTA TTG
	SNRPNqmR	CCC AAA CTA TCT CTT AAA AAA AAC CAC
Sonde	SNRPNelmet	(6FAM)-CGT TTG CGC GGT CG-(MGB)
	SNRPNelun	(VIC)-AAG TAT GTT TGT GTG GTT GTA G-(MGB)

Tabelle 2.5: Mischungsverhältnis der DNAs für die Standardkurve.

Methylierte DNA [%]	Unmethylierte DNA [%]
0	100
1.96	98.04
3.85	96.15
5.66	94.34
9.09	90.91
16.67	83.33
28.57	71.43
37.5	62.5
50	50
66.66	33.34

2.2.10.2 Deletions-Analyse von snoRNA-Genen mittels Realtime-PCR

Ein Deletiosscreening von snoRNA-Genen wurde ebenfalls mit der Realtime-PCR durchgeführt. Dafür wurden für jedes snoRNA-Gen (*HBII-13*, *HBII-436* und *HBII-437*) zwei spezifische Primer und eine FAM-markierte MGB TaqMan[®]-Sonde gelegt. Die PCR wurde an 50 ng DNA durchgeführt. Weitere Bestandteile der PCR waren 12.5 µl TaqMan Universal Master Mix (ohne AmpErase, UNG), je 3 µM 5'- und 3'-Primer, 2.5 µM Sonde und Wasser. Als interne Kontrolle diente der Retinoblastom-Locus auf Chromosom 13. Für diesen Locus wurden ebenfalls spezifische Primer und eine VIC-markierte Sonde bestimmt. Jede DNA wurde für beide Bereiche doppelt untersucht. Um später die Dosis der einzelnen Loci miteinander vergleichen zu können, wurde eine Standardkurve mit einer Kontroll-DNA in unterschiedlichen Verdünnungen (250ng, 125 ng, 50 ng, 25 ng und 12.5 ng) erstellt. Auch hier wurde die PCR mit beiden Sonden durchgeführt. Die PCR-Bedingungen waren wie unter 2.2.10 beschrieben.

Tabelle 2.6: Primer und Sonden für die Deletions-Untersuchung von snoRNA-Genen.

	Name	Sequenz (5' - 3')
Primer	HBII-13-F	GGA AAG ACC TGG GCT GG ATT
	HBII-13-R	CGT TGA GCT TTA CTT CAT CAT GCT
	HBII-436-F	GCC TTG GCT AGG TTC ATG ATG
	HBII-436-R	TGA CTG GAT TTC AGA GTG TCA TTT T
	HBII-437-F	AGG GTT GGC TTA ATG ATG A
	HBII-437-R	CCT CAC GCT CCC TTT GCA
	HBII438A-CEN-F	TCC CAG CTA CTC GAA GGC TTA G
	HBII438A-CEN-R	TCA TTG CAG CCT CCC TGT CT
	HBII-438A-TEL-F	ATT CAT ATA CGT CAT GCG TTC CA
	HBII-438A-TEL-R	TCC AGT AAG CCA CTA AAA AAA TCA AC
	RBg.150024se	ACA ATC AAA GGA CCG AGA AGG A
	RBg.150092as	TGG AGA GGA AGA TTA AGA GGA CAA G
Sonden	HBII13-MGB	(6FAM)-TGA TGA GCT GTG TTT ACT-MGB
	HBII436-MGB	(6FAM)- CAC AGG ACC TTG TCT GA-MGB
	HBII437-MGB	(6FAM)- TTG AAT TGG ATG ACA CTT T-MGB
	HBII438A-CEN-MGB	(6FAM)- CAG GAG AAT CGC TTG AAT-MGB
	HBII438A-TEL-MGB	(6FAM)- CCA CAT CCT GAG ATC T-MGB
	RBg.150047MG	(VIC)- CAA CTG ATC ACC TTG AAT C-(MGB)

2.2.11 Multiplex amplifiable probe hybridization (MAPH)

Mit der Multiplex amplifiable probe hybridization-Methode (Armour *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002) können Deletionen in der DNA an mehreren verschiedenen Loci gleichzeitig untersucht werden. Dadurch ist die Methode sehr gut dazu geeignet, eine große Gruppe von Patienten zu screenen.

2.2.11.1 Herstellung der Sonden

Für die MAPH wurden zunächst mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 2.7) neun unterschiedlich große Fragmente aus dem *HBII-85* snoRNA Gencluster wie in 2.2.7 beschrieben amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit der Microcon-Methode (2.2.9.1) aufgereinigt, in den pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) kloniert (2.2.14) und in *E.coli* DH5 α -Zellen transformiert (2.2.14.4). Die Plasmid-DNA wurde wie in 2.2.3 beschrieben präpariert, ein Aliquot mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten (2.2.5) und mittels Gelelektrophorese (2.2.8) aufgetrennt. Hatten die Fragmente die richtige Größe, wurden sie zur genaueren Charakterisierung zusätzlich sequenziert (2.2.12). Mit einem

Vektor-spezifischen Primer-Paar (MAPH-F und MAPH-R; die Primersequenzen stammen aus der Arbeit von White *et al.*, 2002) wurden die Fragmente aus dem Vektor amplifiziert, die PCR-Produkte mit dem MinElute PCR-Purification Kit (2.2.9.2) aufgereinigt und zu einem Sonden-Mix mit einer Konzentration von 100 pg/µl pro Sonde zusammenpipettiert. Als interne Kontrolle diente eine Sonde aus der TRPS-Region auf dem Chromosom 8 (K in Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Primer für die Herstellung der Sonden.

	Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' -Orientierung)	Annealing-Temperatur	Größe des PCR-Produktes
1	HB85MAPH1F	CAG AGC AAT AGG TGT CG	62°C	100 bp
	HB85MAPH1R	GAG GCA AAG AAA TCC CTT CC	60°C	
2	HB85MAPH3bF	TGT GAG CAA CAG TTT CTT G	64°C	140 bp
	HB85MAPH3bR	GCA AGC CGA TGA CGT TAA A	56°C	
3	HB85MAPH4F	TCC TTCCAG CAT CAC A	60°C	180 bp
	HB85MAPH4R	CAT CAC CAA CCA AGT GAC AGC	64°C	
4	HB85MAPH5F	CGT TGG GAA GAG AGG ACA AG	62°C	161 bp
	HB85MAPH5R	GCA GGA GGC CAA CTG TAT GT	62°C	
5	HB85MAPH6F	TGG GAA TTT TGG ACG TTT GT	56°C	200 bp
	HB85MAPH6R	CAA ACA CCA TGG GAA GTC CT	60°C	
6	HB85MAPH7bF	CAC CCA GCA TAG CCT CTT TG	62°C	220 bp
	HB85MAPH7bR	ACA TCG TTG CTT CAA CAC CT	58°C	
7	HB85MAPH8F	CGT AGC AGC AGT GGA AGT CA	62°C	241 bp
	HB85MAPH8R	TGC AGT ACA CAC CAT GCA AA	60°C	
8	HB85MAPH9F	TGC TTG ATG GCA AAG AGA TG	58°C	265 bp
	HB85MAPH9R	GCT TGG TTG ATG GGA AAA CA	58°C	
9	HB85MAPH10cF	AGG TGT GCA AGG AGT CAC TTA	62°C	287 bp
	HB85MAPH10cR	CAT CCG TAT GAA GCC CAG TT	60°C	
K	L017up	AGT GCC TTT TTA CAT TTT GTG CCA	67°C	106 bp
	L017low	ATG GAA ACT TCA GTG AGC TTG CAA	68°C	

2.2.11.2 Hybridisierung auf Nylon-Filter

Aus einer Hybond Nylonmembran (Amersham) wurden ca. 2 x 3 mm große unterschiedlich geformte Stücke geschnitten. Die zu untersuchende genomische DNA (1 µg) wurde mit 1 µl 1 M NaOH gemischt und langsam auf die Filter pipettiert. Die Membranen wurden an der Luft getrocknet, in Frischhaltefolie gewickelt und die DNA durch UV-Bestrahlung (50 mJ) mit einem UV-Crosslinker (Hoefer) auf der Membran fixiert.

Die Filter wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml Prähybridisierungslösung (0.14 M NaH₂PO₄, 0.36 M Na₂HPO₄, 7% SDS, 100 ng/µl Heringssperma-DNA, 1 mM EDTA) 2 h bei 60°C im Heizblock inkubiert. Danach wurde die Prähybridisierungslösung abgenommen und neue Prähybridisierungslösung (300 µl), die vorher mit 3 µl Cot-1 DNA (1 mg/ml) 2 min aufgekocht wurde auf die Filter pipettiert. Während der Inkubation von 30-60 min bei 60°C wurde die Hybridisierungslösung hergestellt. Dazu wurden 1 µl Sonden-Mix (2.2.11.1), 1 µl Cot-1 DNA, 1 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 1 µl Blocker-Mix (je 20 µM der Primer MAPH-F und -R), 3 µl Wasser, und 2 µl 1 M NaOH zusammenpipettiert, 1 min bei 37°C inkubiert und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 µl 1 M NaH₂PO₄, wurde der Ansatz auf dem Vortexer gemischt und auf die Filter pipettiert. Die Inkubation der Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C. Am nächsten Tag wurden die Filter in 50 ml-Falconröhrchen überführt und bei 60°C je fünfmal mit Wasch-Lösung A (1 x SSC, 1% SDS) und Wasch-Lösung B (0.1 x SSC, 0.1% SDS) für je 45-60 min gewaschen.

2.2.11.3 PCR mit den Vektorspezifischen Primern

Nach der Hybridisierung wurden die Filter gewaschen und einzeln in 200 µl Reaktionsgefäße überführt. Der 50 µl Reaktionsansatz für die PCR enthielt 5 µl 10x PCR-Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 1.25 µl dNTPs (10 mM je dNTP), 0.25 µl *AmpliTaq*[®] Polymerase (5 U/µl), je 0.5 µl MAPH-F- und MAPH-R-Primer (je 20 µM; White *et al.*, 2002) und Wasser. Die PCR-Bedingungen waren 5 min 94°C, fünf Zyklen mit 45 sec 94°C, 1 min 57°C und 1 min 68°C und 10 min 68°C. Mit 2.5 µl aus diesem PCR-Ansatz wurde eine zweite PCR durchgeführt. Die Komponenten waren, bis auf den MAPH-F-Primer dieselben wie bei der ersten PCR. Der MAPH-F-Primer wurde gegen einen Fluoreszenz-markierten Primer ausgetauscht (MAPH-F-FAM). Die PCR-Bedingungen waren ebenfalls dieselben wie oben beschrieben. Allerdings wurde die Zyklenzahl hier auf 23 erhöht. Die PCR-Produkte wurden mit dem ABIprism[®] 3100 Genetic Analyzer und der *GeneScan*[™] Analyse Software sowie dem Programm *Genotyper* (Applied Biosystems) analysiert.

Tabelle 2.8: Vektorspezifische Primer.

Name des Primers	Sequenz des Primers (5' - 3' -Orientierung)	Annealing- Temperatur	Größe des PCR-Produktes
MAPH-F	GGC CGC GGG AAT TCG ATT	58°C	je + 39 bp
MAPH-R	GCC GCG AAT TCA CTA GTG	56°C	
MAPH-F-FAM	(6FAM)- GGC CGC GGG AAT TCG ATT	58°C	

2.2.12 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von PCR-Produkten wurde mit dem automatischen Sequenziergerät ABIprism[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurden fluoreszenzmarkierte Terminatoren im Prism[™] Bigdye[™] TerminatorCycle Sequencing ReadyReactionKit von Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die lineare Reaktion wurde bei PCR-Produkten mit einem spezifischen Primer durchgeführt und bei klonierten Fragmenten wurden die vektorspezifischen Primer T3, T7, sp6 und M13 bei einer *Annealing*-Temperatur von 45°C verwendet. Die Reaktion erfolgte im GeneAmp[®] PCR System 9700 oder 2700. Nach der Sequenzierreaktion wurden die DNA-Fragmente mit Ethanol gefällt und gewaschen. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm „DNAS[™]“ (Lasergene) oder mit „Sequencher“ der Firma Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA. Die Suche nach Sequenzhomologien erfolgte in der DNA-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.13 Southern-Blot-Analyse

2.2.13.1 Southern-Blot

Um DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran zu transferieren, wurde das Gel zur Denaturierung der DNA 30 min in Denaturierungslösung (0.25 M NaOH, 0.6 M NaCl) geschwenkt. Die einzelsträngige DNA wurde nach der Methode von Southern (1975) auf eine Hybond Nylonmembran (Amersham) übertragen. Dazu wurde das Gel auf zwei Lagen 10x SSC-getränkten Filterpapiers (3MM, Whatman) gelegt, deren überhängende Enden in ein Pufferreservoir von 500 ml 10x SSC eintauchten. Auf das Gel wurde eine in 4x SSC getränkte Nylonmembran gelegt und darauf zwei in 4x SSC getränkte Filterpapiere sowie ein Stapel saugfähiges Zellstoffpapier. Die Konstruktion wurde mit einem Gewicht beschwert. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran kurz in 4x SSC geschwenkt, getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung von 5 min bei 302 nm oder in einem UV-Crosslinker (Hoefer) auf der Membran fixiert.

2.2.13.2 Radioaktive Markierung von DNA

Die DNA, die als Sonde für eine radioaktive Hybridisierung verwendet werden sollte, wurde mit der *random-oligo-priming*-Methode von Feinberg und Vogelstein (1983; 1984) markiert. Bei dieser Methode werden Hexanukleotide mit allen möglichen Nukleotidabfolgen (*random oligos*) als Primer für die Klenow-Polymerase eingesetzt. Letztere synthetisiert an der einzelsträngigen DNA-Sonde den komplementären Strang und baut dabei radioaktive Nukleotide ein. Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1 ng/μl mit H₂O verdünnt und 15 ng der Sonde wurden mit 5 μl OLB (*oligo labelling buffer*) vermischt, 5 min gekocht, auf Eis gestellt und 1 Unit Klenow-Polymerase sowie 25 μCi [α^{32} P]dCTP [10 μCi/μl] zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei RT inkubiert. Um die nicht eingebauten Nukleotide von der Sonde zu trennen, wurde der Ansatz mit 25 μl 10 mM EDTA vermischt, auf Mikrofilter mit einer Porengröße von 0.5 μm pipettiert und 30 min gegen H₂O dialysiert. Anschließend wurde die Sonde abgenommen, der Filter mit 50 μl 10 mM EDTA gewaschen und der radioaktive Einbau durch Messung eines 5 μl-Aliquots im Szintillationszähler (nach Cerenkov) gemessen.

OLB: 50 μl Lösung A + 125 μl Lösung B + 75 μl Lösung C
Lösung A: 0.5 ml 1.25 M Tris-HCl pH 8.0, 0.125 M MgCl₂ + 9 μl β-Mercaptoethanol
+ je 2.5 μl 0.1 M dATP, dGTP, dCTP
Lösung B: 0.2 M HEPES pH 6.6
Lösung C: 50 OD pd(N)₆ (Pharmacia) + 550 μl TE

2.2.13.3 Hybridisierung

Der Southern-Blot (2.2.13.1) wurde in einem 50 ml-Falconröhrchen mit 4 ml Hybridisierungslösung (4x SSPE, 6% PEG M_r 15000-20000 SIGMA P2263, 2x Denhardts-Lösung, 0.5% SDS, 100 μg/ml denaturierte Lachssperma-DNA) für 2 h bei 65°C im Rotationsofen (Bachofer) inkubiert. Danach wurden von der hitzedenaturierten Sonde 1.0 x 10⁶ bis 1.5 x 10⁶ cpm pro ml Hybridisierungslösung zugegeben und der Southern-Blot über Nacht im Rotationsofen bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde der Southern-Blot dreimal bei RT mit 2x SSC, 0.1% SDS gewaschen. Die Stringenz der anschließenden Waschschritte richtete sich nach dem Hybridisierungsverhalten der radioaktiven Sonde (ca. 10 min bei 65°C mit 2x SSC bzw. 0.1% SDS bis 0.1x SSC bzw. 0.1% SDS). Zur Wiederverwendung eines hybridisierten Southern-Blots wurde die radioaktiv markierte Sonde durch Inkubation für 30 min in kochender 0.1% SDS-Lösung abgewaschen, der Blot getrocknet, in Frischhaltefolie verpackt und bei 4 °C gelagert.

2.2.13.4 Autoradiographie

Nach einer Hybridisierung wurden die gewaschenen Southern-Blots kurz getrocknet, auf eine Plastikunterlage gelegt, in Frischhaltefolie gepackt und in eine Filmkassette mit Verstärkerfolie (Dupont Cronex lightning plus) gelegt. Die verwendeten Röntgenfilme (Fuji Xray RX) wurden vorgeblitzt und auf die Southern-Blots gelegt. Die Exposition erfolgte je nach Signalstärke für 1 bis 14 Tage bei -80°C.

2.2.14 Subklonierung von DNA-Fragmenten

2.2.14.1 Vektor-DNA

Die Subklonierungen PCR-Produkten wurde mit dem pGEM[®]-T Easy Vektor (Promega) und dem dazugehörigen Puffer nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.14.2 Insert-DNA

Die PCR-Produkte für die Subklonierung wurden entweder direkt aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe der Microcon- (2.2.9.1) bzw. MinElute PCR-Purification-Methode (2.2.9.2) oder aus dem Agarosegel mit Hilfe des MinElute Gel-Extraction-Kits (2.2.9.3) aufgereinigt.

2.2.14.3 Ligation

Bei einer Klonierung von PCR-Produkten wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA für die Ligation benötigt. Die Ligation mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurde mit 5 Units T₄-DNA-Ligase (Boehringer) in 1x Ligasepuffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) angesetzt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Für das pGEM[®]-T Easy Vektor System wurde ein dreifacher molarer Überschuss an Insert-DNA eingesetzt. Die Konzentration der PCR-Produkte wurde durch Auftragen auf ein Agarosegel abgeschätzt. Die Ligation wurde mit 3 Units T₄-DNA-Ligase (Promega) in 1x Ligasepuffer (30 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 10% Polyethylenglycol) angesetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.14.4 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Bakterienzellen, die DNA aus der sie umgebenden Lösung aufnehmen können (kompetente Zellen), wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.*, 1982) gewonnen. Eine Bakterienkolonie des *E. coli*-Stammes DH5α wurde in 10 ml φb-Medium (für 1 Liter: 5 g Hefe-Extrakt, 20 g Trypton, 5 g MgSO₄, pH 7.6 [mit KOH]) bei 37°C und 250 rpm inkubiert, bis die Kultur eine OD₅₅₀ von 0.3 erreicht hatte. Von

der Kultur wurden 5 ml in 100 ml ϕ b-Medium überführt und bei 37°C inkubiert. Bei Erreichen eines OD₅₅₀-Wertes von 0.48 wurden je 25 ml der Kultur in vorgekühlte 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen für 15 min bei 1250g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 10 ml kaltem TfbI-Puffer (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glyzerin, pH 5.8 [mit 0.2 M HAc]) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wurden die Zellen 15 min bei 1250 g und 4°C zentrifugiert und in 1 ml kaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glyzerin, pH 6.5 [mit KOH]) gelöst. Die Bakteriensuspension wurde mit vorgekühlten Pipettenspitzen in 100 μ l-Aliquots in eiskalte Eppendorfgefäße gegeben, in einem Ethanol/Trockeneisbad schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Für eine Transformation wurden 50 μ l der kompetenten DH5 α -Zellen mit 3-8 μ l Ligationsansatz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min bei 42°C) wurde der Ansatz kurz auf Eis gestellt, mit 450 μ l LB-Medium gemischt und 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Danach wurden je 150 μ l und 350 μ l der Kultur auf LB-Indikatorplatten (100 μ g/ml Ampicillin, 40 μ g/ml X-Gal) verteilt, die eine Blau/Weiß-Selektion nach Sambrook *et al.* (1989) ermöglichen. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C waren weiße (mit Insertion von DNA in den Vektor) und blaue Kolonien (ohne Insertion von DNA in den Vektor) sichtbar. Von den weißen Kolonien wurde die DNA präpariert (2.2.3), mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Von den rekombinanten Klonen wurden Stammkulturen (500 μ l der ÜNK mit 500 μ l sterilem Glyzerin) angelegt und bei -80°C gelagert.

2.2.15 Klonierung von Fibroblasten

Durch eine Hautbiopsie wurden Fibroblasten entnommen und in Zellkulturflaschen im AminoMax-Medium (Gibco Invitrogen) mit C100-Supplement bei 37°C und bei einem CO₂-Partialdruck von 5% kultiviert bis sie eine Dichte von etwa 75% erreichten. Um die DNA aus den Zellen zu isolieren, wurde das Medium abgesogen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA behandelt, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst hatten. Zur Weiterbehandlung wurden die Zellen in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Für die Einzelzellklonierung wurden die Fibroblasten zu Prof. Uwe Claussen ins Institut für Humangenetik der Universität von Jena geschickt. Dort wurden sie wie in 2.2.15 beschrieben vermehrt. Unter dem Mikroskop wurden einzelne Zellen mit Hilfe einer Pasteur-Pipette gepickt, in neue Zellkulturflaschen überführt und nach etwa 20 Verdopplungen geerntet. In 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt, wurden sie dann zur DNA-Präparation wieder an uns zurückgeschickt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Somatisches Mosaik in Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt

Etwa 2-4% aller Patienten mit AS haben einen Imprinting-Defekt. Diese Patienten haben zwar zwei Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, jedoch mit einem väterlichen Epigenotyp auf ihrem mütterlichen Chromosom. In ca. 10% dieser Patienten stellt der falsche Epigenotyp eine sekundäre Epimutation in Folge einer Deletion des Imprinting Centers dar (Buiting *et al.*, 1995). In der Mehrzahl der Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt ist die Epimutation ohne vorherige DNA-Sequenz-Veränderung entstanden (primäre Epimutation) (Buiting *et al.*, 2003).

3.1.1 Methylierungs-Auffälligkeiten in 26 ASID-Patienten

Die *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region auf dem Chromosom 15 liegt differenziell methyliert vor. Die CpG-Dinukleotide auf dem paternalen Chromosom sind nicht methyliert, während sie auf dem maternalen Chromosom methyliert sind. Durch eine Bisulfit-Behandlung werden diese allelischen Methylierungsunterschiede in allelische Sequenzunterschiede umgewandelt (siehe 2.2.8). Dazu wird die DNA mit Natriumbisulfit behandelt, wodurch unmethylierte Cytosin-Reste durch Uracil und diese in der nachfolgenden methylierungsspezifischen PCR (MS-PCR, Zeschnigk *et al.*, 1997) durch Thymin ersetzt werden. Mit sequenzspezifischen Primern werden so beide Allele spezifisch amplifiziert. Bei einer Normalperson (NP) entstehen beide PCR-Produkte, während bei Patienten mit einer großen Deletion in der Region 15q11-q13, einer UPD oder einem Imprinting-Defekt nur die unmethylierte (AS) oder methylierte (PWS) Bande (siehe AS DEL und PWS DEL in Abb. 3.1) zu finden ist (Nazlican *et al.*, 2004).

Bei 26 von 85 Patienten (32%) mit AS und einem Imprinting-Defekt ohne IC-Deletion (ASID) ist zusätzlich noch eine schwache methylierte Bande zu erkennen. Dieses auffällige Muster deutet auf ein Methylierungs-Mosaik in diesen Patienten hin.

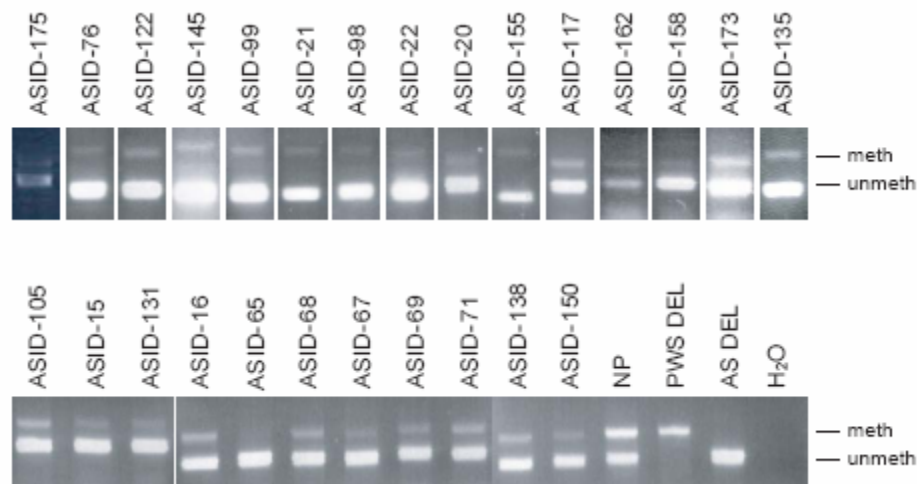


Abb. 3.1: Methylierungsspezifische PCR-Analyse von 26 Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt ohne IC-Deletion (ASID). Als Kontrollen wurde DNA von Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion der Region 15q11-q13 (AS DEL, PWS DEL) sowie einer Normalperson (NP) verwendet. Meth, methylierte maternale Bande; unmeth, unmethylierte paternale Bande; H₂O, Leerkontrolle.

3.1.2 Methylierungs-Mosaik in zwei AS-Patienten

Es gibt zwei mögliche Ursachen für die schwache Bande. Die erste Möglichkeit ist, dass in der *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region nicht alle CpGs gleichmäßig methyliert bzw. unmethyliert vorliegen, sodass die methylierungsspezifischen Primer falsch binden. Um das zu untersuchen, wurde die Bisulfit-behandelte DNA des Patienten ASID-138 mit spezifischen Primern amplifiziert, das PCR-Produkt kloniert und die erhaltenen Klone sequenziert (3.1.2.1). Die zweite Möglichkeit ist das Vorliegen eines zellulären Mosaiks; d.h. die Patienten haben eine normale Zelllinie und eine Zelllinie mit einem Imprinting-Defekt. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, wurde mit der DNA aus 48 Fibroblasten-Einzelzellklonen des Patienten ASID-71 eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt (3.1.2.2).

3.1.2.1 Bisulfit-Sequenzierung klonierter PCR-Produkte

Bisulfit-behandelte DNA aus dem Blut des Patienten ASID-138 wurde mit Primern amplifiziert (siehe 2.1.7.2), die sowohl an das methylierte als auch an das unmethylierte Allel binden. Das 346 bp große PCR-Fragment aus der *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region, das 23 CpGs beinhaltet, wurde kloniert und die Klone anschließend sequenziert. In acht von zehn Klonen waren alle Cytosin-Reste in Thymin umgewandelt (weiße Kreise in Abb. 3.2). Diese Klone repräsentieren ein komplett unmethyliertes Allel. In den restlichen zwei Klonen

waren die CpGs unverändert (schwarze Kreise). Diese repräsentieren ein komplett methyliertes Allel. Dass in allen zehn Klonen alle CpGs vollständig methyliert bzw. unmethyliert vorlagen, lässt vermuten, dass bei diesem Patienten ein zelluläres Mosaik vorliegt. Das Verhältnis von acht methylierten Allelen zu zwei unmethylierten Allelen zeigt, dass im Blut dieses Patienten 40% der Zellen eine normale Methylierung und 60% der Zellen einen Imprinting-Defekt haben. Dieses Ergebnis kommt auch dem Ergebnis der quantitativen Realtime-PCR mit 32% normalen Zellen sehr nahe (3.1.4).

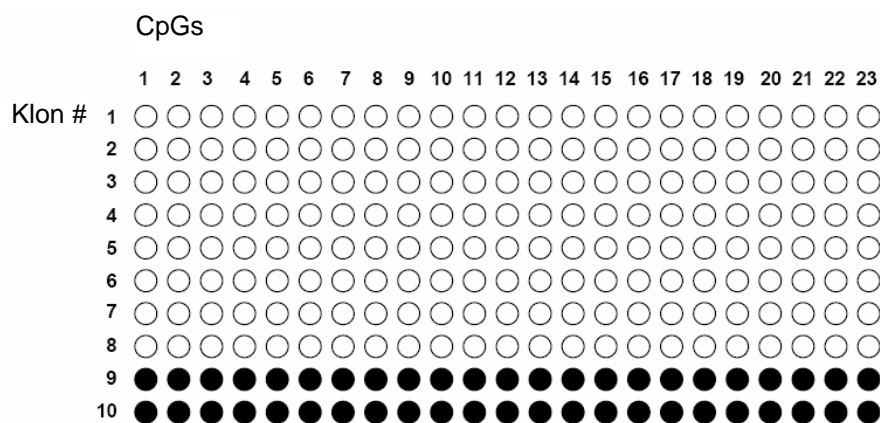


Abb. 3.2: Methylierungs-Analyse der *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region in Blut-DNA des Patienten ASID-138. Weiße Kreise, unmethylierte CpGs; schwarze Kreise, methylierte CpGs.

3.1.2.2 Methylierungs-Analyse von Fibroblasten-Einzelzellklonen

Die durch eine Hautbiopsie entnommenen Fibroblasten des Patienten ASID-71 wurden wie in 2.2.17 beschrieben vereinzelt und kloniert. Nach etwa 20 Zellteilungen wurden sie geerntet. Die DNA aus 48 Klonen wurde isoliert und daran wurde eine MS-PCR durchgeführt. Das Ergebnis dieser PCR ist in Abb. 3.3 beispielhaft dargestellt. In 34 Zelllinien war ein AS-Methylierungsmuster (siehe Klone 1.16, 1.17, 1.20, 1.22 und 1.23) und in 14 Zelllinien ein normales Methylierungsmuster (siehe Klone 1.18, 1.19, und 1.21) zu finden. Unter der Voraussetzung, dass die Methylierung für mindestens 30 Zellteilungen stabil bleibt, ist dies ein Beweis für das Vorhandensein von zwei unterschiedliche Zelllinien in diesem Patienten.

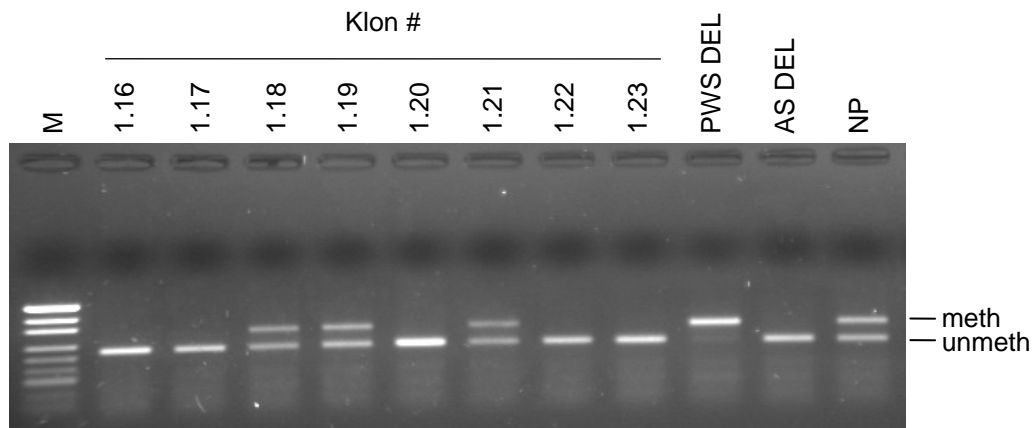


Abb. 3.3: MS-PCR-Analyse von klonierten Fibroblasten des Patienten ASID-71. Als Größenstandard (M) wurde der pUC-Marker verwendet. Als Kontrollen wurde DNA von Patienten mit PWS bzw. AS und einer *de novo* Deletion der Region 15q11-q13 (AS DEL, PWS DEL) sowie einer Normalperson (NP) verwendet. Meth, methylierte maternale Bande; unmeth, unmethylierte paternale Bande; H₂O, Leerkontrolle.

Dieses Ergebnis würde man auch bekommen, wenn eine Chimärität vorliegt; d.h. der Patient aus zwei miteinander verschmolzenen Zygoten hervorgegangen ist, von denen eine einen Imprinting-Defekt hat. Während man bei einer Chimären an einem Loci vier unterschiedliche Allele finden kann (zwei paternale und zwei maternale Allele), müssten bei einem Patienten mit Mosaik nur zwei unterschiedliche Allele zu finden sein (ein paternales und ein maternales Allel). Um das zu untersuchen, wurden eine Imprinting-Defekt-Zelllinie und eine normale Zelllinie mit Mikrosatelliten (*D15S817*, *D15S128*, *D15S1234*, *CYP19*, *D15S100*, *FES*, *D3S1744*, *D3S3050*, *D3S2406*, *D6S1019*, *D6S1034*, *D6S477*, *TRPS*, *EXT1*, *D8S200*) an 15 verschiedenen Loci genotypisiert. In beiden Zelllinien wurden an allen 15 Loci zwei unterschiedliche Allele gefunden (nicht gezeigt). Eine Chimärität ist somit sehr unwahrscheinlich und man kann davon ausgehen, dass der Patient ein zelluläres Mosaik darstellt.

3.1.3 Eingrenzung des Zeitpunktes der Imprinting-Defekt-Entstehung mit Hilfe der X-Inaktivierungs-Untersuchung in Einzelzellklonen

Frauen besitzen in ihren somatischen Zellen zwei X-Chromosomen (ein paternales und ein maternales X-Chromosom). Um eine Dosis-Kompensation von x-chromosomal kodierten Genen gegenüber männlichen Zellen mit nur einem, maternalen X-Chromosom zu erzielen, wird ein X-Chromosom in der weiblichen Zelle inaktiviert. Diese Abschaltung erfolgt randomisiert (nach Zufall) in der inneren Zellmasse des Blastozysten kurz nach der

Implantation des Embryos (Monk *et al.*, 2002; Huynh *et al.*, 2003; Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Hinsichtlich der elterlichen Herkunft seiner aktiven X-Chromosomen stellt der weibliche Organismus ein Mosaik dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Zeitpunkt der X-Inaktivierung genutzt, um den Zeitpunkt der postzygoten Entstehung des Imprinting-Defekts näher zu bestimmen. Hat der Imprinting-Defekt vor der X-Inaktivierung stattgefunden, sollten Imprinting-Defekt-Zellen zu finden sein, in denen das paternale X-Chromosom inaktiviert wurde und solche, in denen das maternale X-Chromosom inaktiviert wurde. Fand der Imprinting-Defekt jedoch nach der X-Inaktivierung statt, sollte in allen Zellen das gleiche X-Chromosom inaktiviert vorliegen.

Für eine X-Inaktivierungs-Untersuchung wurde der *FMRI*-Locus (fragile X mental retardation 1) genutzt, da die Patientin ASID-71 für den untersuchten Repeat von CGG-Trinukleotiden heterozygot und somit informativ war. Dazu wurde wie in Carrel *et al.* (1996) beschrieben mit dem methylierungssensitiven Enzym *HpaII* verdaut DNA aus den Einzelzellklonen der Patientin mit fluoreszenz-markierten Primern amplifiziert. Die Primer flankierten dabei eine sich wiederholende Sequenz von 6-44 CGG-Trinukleotiden. Das Blut der Eltern diente als Kontrolle und dazu, den Ursprung der Allele zu ermitteln. Wie in der Tabelle 3.1 zusammengefasst, lag in 29 Imprinting-Defekt-Zelllinien das paternale X-Chromosom mit 27 CGG-Wiederholungen und in 4 Imprinting-Defekt-Zelllinien das maternale X-Chromosom mit 29 CGG-Wiederholungen inaktiviert vor. In einer Zelllinie (1.13) waren beide X-Chromosomen inaktiviert. Möglicherweise ist diese Zelllinie nicht aus einer Einzelzelle sondern aus zwei Zellen hervorgegangen. In 14 normalen Zelllinien war die Verteilung ähnlich wie in den Imprinting-Defekt-Zelllinien. Hier waren in 13 Zelllinien das paternale und in einer Zelllinie das maternale X-Chromosom inaktiv. Ist der Imprinting-Defekt in einer einzelnen Zelle entstanden, so kann man davon ausgehen, dass er vor der X-Inaktivierung stattgefunden haben muss.

Tabelle 3.1: Ergebnis der X-Inaktivierungs-Untersuchung.

Klon #	inaktives X	
	paternal	maternal
ID-Zelllinien		
1.2	x	
1.3	x	
1.4	x	
1.6	x	
1.7	x	
1.8	x	
1.10	x	
1.11	x	
1.12	x	
1.13	x	x
1.15	x	
1.16	x	
1.17	x	
1.20		x
1.22	x	
1.23	x	
1.25	x	
1.27	x	
1.28	x	
1.30	x	
1.31		x
1.36	x	
1.37	x	
1.38		x
1.39	x	
1.41	x	
1.42	x	
1.43	x	
1.44		x
1.45	x	
1.47	x	
1.49	x	
1.50	x	
1.51	x	
Normale Zelllinien		
1.1	x	
1.5	x	
1.9	x	
1.14	x	
1.18	x	
1.19	x	
1.21	x	
1.24	x	
1.26	x	
1.32	x	

3.1.4 Quantitative Analyse des zellulären Mosaiks

Die quantitative Analyse von methylierten Allelen wurde mit der Realtime-PCR-Methode QAMA (quantification of methylated alleles) durchgeführt (Zeschnigk *et al.*, 2004). Zunächst wurde die DNA mit Natriumbisulfit behandelt. Die dadurch erreichte Sequenzveränderung wurde in der anschließenden Realtime-PCR zur Unterscheidung der Allele genutzt (siehe auch 3.1.1). Die Primer wurden in einen Bereich der *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region gelegt, die keine CpGs enthielt und beide Allele identisch in ihrer Sequenz waren. Dadurch konnten beide Allele in einem einzelnen PCR-Ansatz mit derselben Effizienz amplifiziert werden. Um die Allele dennoch voneinander unterscheiden zu können, wurden die unterschiedlich farbmarkierten Sonden so gelegt, dass sie in dem 238 bp großen Fragment vier CpGs spannten und dadurch nur an das methylierte bzw. unmethylierte Allel binden konnten. Die Sonde für das methylierte Allel wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM und die für das unmethylierte Allel mit VIC markiert. Die während der PCR-Reaktion durch das Degradieren der Sonden entstandenen Fluoreszenzsignale wurden gemessen. Um mögliche Pipettierfehler auszugleichen, wurde für jede DNA eine Doppelbestimmung gemacht. Am Ende der PCR erhielt man einen C_T -Wert (Schwellenzyklus) für jede Sonde, welcher der PCR-Zykluszahl entsprach, bei der das Fluoreszenz-Signal eine bestimmte Intensitätsschwelle, die über dem Hintergrundrauschen und in der exponentiellen Phase der Reaktion lag, überschritten hatte. Dieser Wert verhielt sich umgekehrt proportional zur Anzahl der eingesetzten Zielmoleküle: je höher die Anzahl der Zielmoleküle, desto niedriger war der C_T -Wert. Aus den beiden C_T -Werten der Doppelbestimmung wurden jeweils die Mittelwerte gebildet und für jeden Ansatz die Differenz (ΔC_T) zwischen den C_T -Mittelwerten beider Sonden berechnet ($\Delta C_T = \text{Mittelwert } C_{T-VIC} - \text{Mittelwert } C_{T-FAM}$).

Zuerst wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde vor der Bisulfit-Behandlung die DNA eines Patienten mit PWS und uniparentaler Disomie (zwei methylierte Allele), mit der DNA eines Patienten mit AS und einer Deletion (ein unmethyliertes Allel) in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (siehe 2.2.12.1). Die wie oben berechneten ΔC_T -Werte wurden gegen die Menge an methylierter DNA in den einzelnen Ansätzen aufgetragen. Mit Hilfe des Programms Mathematica 5 wurde die unten abgebildete Standardkurve erstellt (Abb. 3.4). Die Gleichung der so entstandenen sigmoiden Kurve (Methylierung in % = $100/(2^{-(\Delta C_T - 1.61)/1.26} + 1)$) wurde zur quantitativen Bestimmung der

methylierten Allele in den einzelnen Patienten verwendet. Überschritt nur eine Kurve die Intensitätsschwelle, wurde der Wert für diese auf 100% gesetzt.

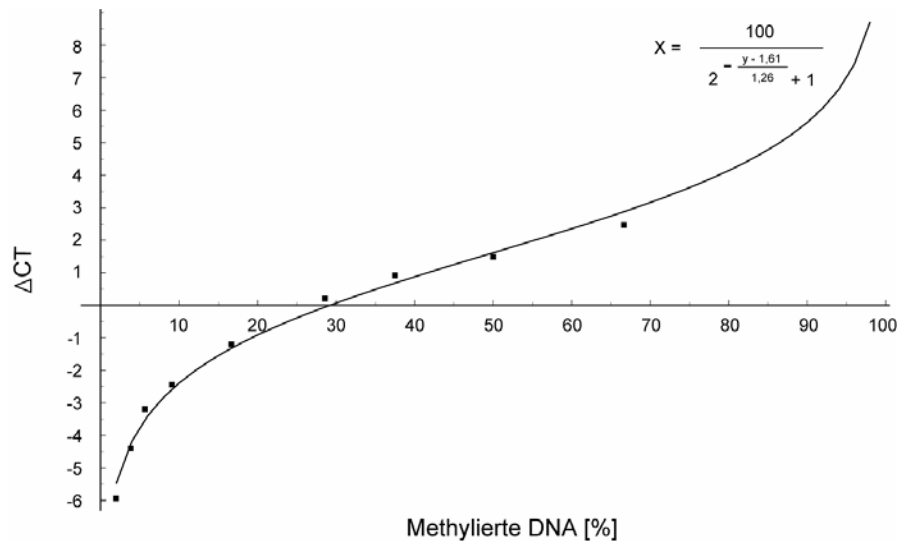


Abb. 3.4: Standardkurve für die quantitative Analyse von methylierten Allelen. ΔC_T , Differenz zwischen den C_T -Mittelwerten der FAM-markierten und der VIC-markierten Sonde.

Mit Hilfe der Formel dieser Standardkurve wurde die Menge an normal methylierten Zellen in 24 Patienten ermittelt. Während in den Kontrollen (NP 1 und NP 2) fast alle Zellen (90% und 96%) eine normale Methylierung aufweisen (siehe Abbildung 3.5), ist in den ASID-Patienten eine normale Methylierung in nur <1% bis 40% der Blutzellen zu finden.

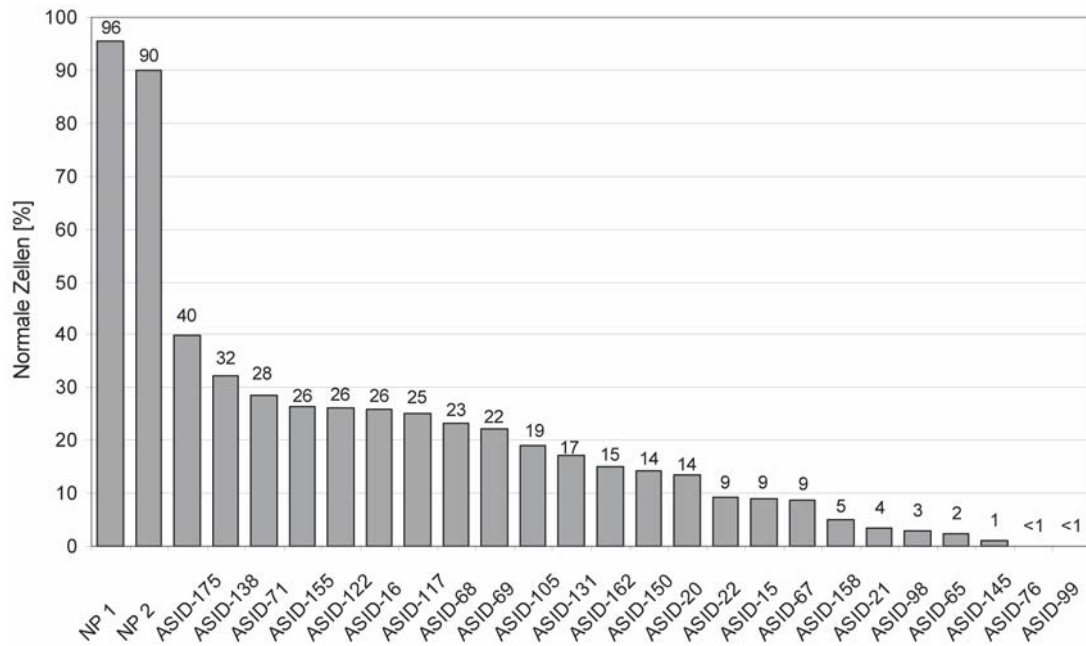


Abb. 3.5: Diagramm der Menge an normal methylierten Zellen in den 24 ASID-Patienten und zwei Normalpersonen (NP 1 und NP 2).

3.1.5 Genotyp-Phänotyp-Korrelation mittels der Regressionsanalyse

Um zu untersuchen, ob eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation besteht, d.h. der Grad der Methylierung etwas über den Schweregrad der Erkrankung aussagt, wurden zunächst mit Hilfe eines Fragebogens klinische Daten abgefragt (siehe Tabelle 3.2). Von 24 Fragebögen, die an die betreuenden Ärzte geschickt wurden, kamen 17 vollständig und zwei unvollständig beantwortet zurück. Wie in der Tabelle 3.2 aufgeführt, kamen neun dieser Patienten mit der anfänglichen Verdachtsdiagnose PWS in die Sprechstunde. Fünf dieser Patienten waren aufgrund ihrer für AS untypischen klinischen Symptomatik bereits 1999 von Prof. Gillessen-Kaesbach publiziert worden (Gillessen-Kaesbach *et al.*, 1999).

Tab. 3.2: Klinische Daten. Die Patienten sind nach dem Grad ihrer Methylierung angeordnet

	ID									
	ASID-138	ASID-71	ASID-155	ASID-122	ASID-16	ASID-117	ASID-68	ASID-69	ASID-105	ASID-131
Alter bei Befragung	21.7 Jahre	13.1 Jahre	13.2 Jahre	7.9 Jahre	29.2 Jahre	11.3 Jahre	9.4 Jahre	10.4 Jahre	6.2 Jahre	8.3 Jahre
Verdachtsdiagnose	PWS	PWS	PWS	AS	MR	AS	PWS	PWS	AS	PWS
Daten bei der Geburt										
Gewicht	3540 g	3000 g	3650 g	2900 g	n.a.	2268 g	4850 g	3320 g	3570 g	3540 g
Größe	50.8 cm	54 cm	52 cm	48 cm	n.a.	n.a.	58 cm	53 cm	n.a.	54 cm
Kopfumfang	35.2 cm (2 Wochen nach der Geburt)	34 cm	35 cm	33 cm	n.a.	n.a.	38 cm	35 cm	35 cm	35 cm
Muskuläre Hypotonie	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Stillprobleme	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—
Gehen	18 Monate	18 Monate	15 Monate	18 Monate	n.a.	21 Monate	24 Monate	24 Monate	14 Monate	16 Monate
Sprache	18 Monate	2 Jahre	3 Jahre	1 Jahre	n.a.	n.a.	n.a.	2 Jahre	18 Monate	1-1.5 Jahre
Sprachentwicklung	10 Wörter	einfache Sätze	einfache Sätze	50 Wörter	n.a.	keine	keine	20-30 Wörter	20 Wörter	20 Wörter
Auffassungsgabe	gut	gut	gut	wenig	gut	gut	keine	wenig	gut	gut
Unkontrolliertes Lachen	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—
Krämpfe	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Ataxie	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—
Mikrozephalie	—	—	—	—	n.a.	—	—	—	—	—
Übergewicht	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+
Hyperphagie	+	+	+	+	—	—	+	—	—	+

+, vorhanden; -, nicht vorhanden; n.a., nicht angegeben

Tab. 3.2 (Fortsetzung): Klinische Daten. Die Patienten sind nach dem Grad ihrer Methylierung angeordnet

	ID								
	ASID-150	ASID-22	ASID-15	ASID-67	ASID-21	ASID-98	ASID-65	ASID-145	ASID-76
Alter in Jahren	9.8 Jahre	21.9 Jahre	13.2 Jahre	13.7 Jahre	8.5 Jahre	14.2 Jahre	15.9 Jahre	11.3 Jahre	27.5 Jahre
Verdachtsdiagnose	PWS	AS	PWS	PWS	AS	AS	AS	AS	AS
Daten bei der Geburt									
Gewicht	3820 g	2740 g	4050 g	3800 g	3190 g	3100 g	3400 g	2830 g	3750 g
Größe	55 cm	46 cm	56 cm	50 cm	55 cm	50 cm	n.a.	54 cm	n.a.
Kopfumfang	35 cm	33 cm	36.5 cm	n.a.	35.5 cm	35 cm	n.a.	34.5 cm	n.a.
Muskuläre Hypotonie	+	—	—	später	+	+	—	—	—
Stillprobleme	—	—	—	—	—	+	+	—	—
Gehen	18 Monate	13 Monate	16 Monate	30 Monate	31 Monate	18 Monate	36 Monate	30 Monate	10-30 Monate
Sprache	18 Monate	2.5 Jahre	n.a.	7 Jahre	3.5 Jahre	4 Jahre	n.a.	7 Jahre	n.a.
Sprachentwicklung	60 Wörter	einfache Sätze	keine	2-3 Wörter	2 Wörter	7-8 Wörter	keine	10 Wörter	6 Wörter
Auffassungsgabe	gut	gut	gut	wenig	wenig	wenig	gut	wenig	wenig
Unkontrolliertes Lachen	—	+	—	—	+	+	+	—	+
Krämpfe	—	—	—	+	—	—	—	+	+
Ataxie	+	—	—	—	+	+	—	—	+
Mikrozephalie	—	—	—	—	+	—	—	—	n.a.
Übergewicht	+	+	+	+	—	+	—	—	+
Hyperphagie	+	—	+	—	—	+	+	—	—

+, vorhanden; -, nicht vorhanden; n.a., nicht angegeben

Zur Quantifizierung des Schweregrades der Krankheit, wurden für jedes der klinischen Merkmale Punkte von 0 bis 1 vergeben. Je höher die erreichte Punktzahl, desto milder ist der Krankheitsverlauf. Die grauen Balken in der Abbildung 3.6 stellen die erreichten Punkte dar. Die Summe der klinischen Punkte und der Grad der Methylierung, die von den 17 ASID-Patienten erreicht wurden, sind in der Abbildung unten zusammengefasst.

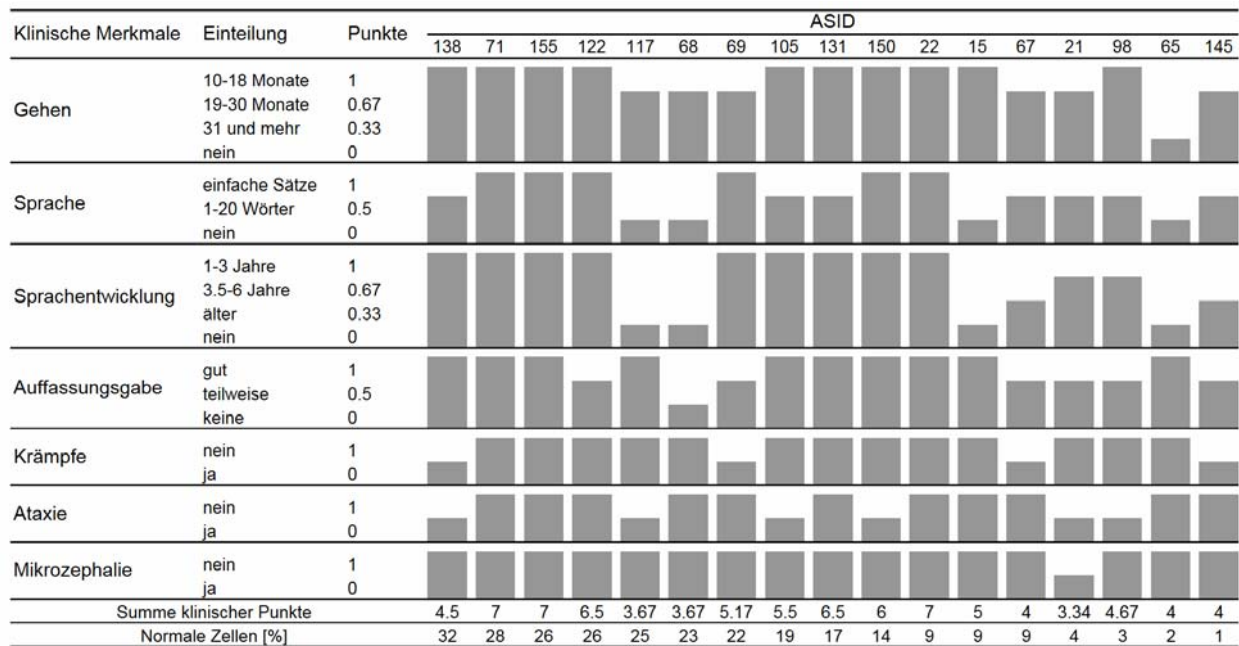


Abb. 3.6: Punkte-Verteilung für klinische Merkmale in 17 ASID-Patienten.

Um eine Korrelation zwischen dem Grad der Methylierung und den klinischen Merkmalen herleiten zu können, wurde mit dem Software-Paket R1.8.1 (<http://r-project.org>) eine lineare Regression durchgeführt. Die so erstellte Regressionskurve (Abb. 3.7) zeigt eine positive Steigung, was darauf deutet, dass Patienten mit einem höheren Grad an Methylierung eine Tendenz für einen milderen Krankheitsverlauf haben. Jedoch ist der p-Wert mit 0.139 nicht signifikant.

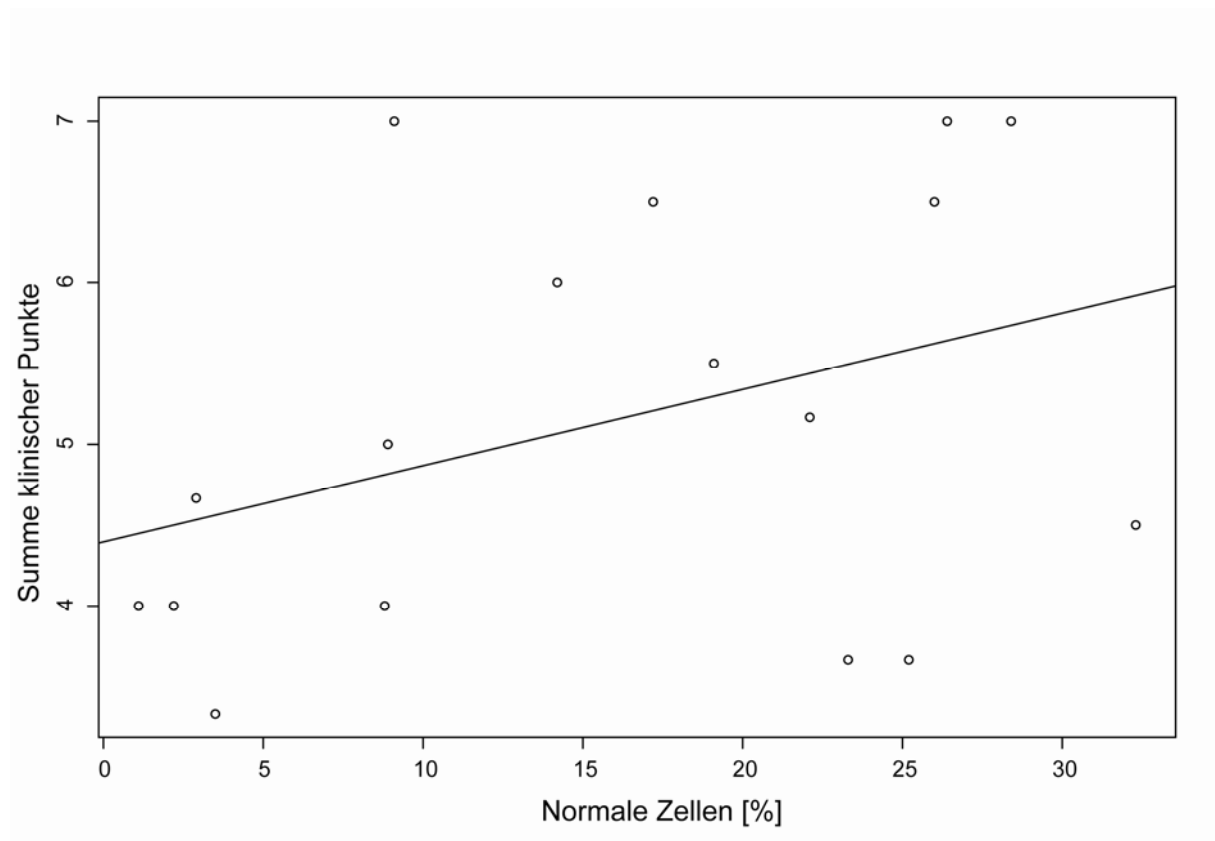


Abb. 3.7: Lineare Regressionsanalyse. Die Menge an normal methylierten Zellen wurde gegen die Summe der erreichten klinischen Punkte aufgetragen. Der p-Wert für die so erstellte Regressionskurve beträgt 0.139.

3.2 Somatisches Mosaik in einem Patienten mit PWS und einem Imprinting-Defekt

Nur etwa 1% aller Patienten mit PWS haben einen Imprinting-Defekt. Im Gegensatz zu Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt haben diese Patienten zwei Chromosomen 15 mit demselben maternalen Epigenotyp. Ein somatisches Mosaik in PWS-Patienten kommt sehr viel seltener vor als in AS-Patienten. Bislang sind nur wenige Fälle bekannt. In der Arbeit von Horsthemke *et al.* (2003) ist ein Patient mit einem upd(15)mat-Mosaik beschrieben. Dieser Patient hat neben normalen Zellen, auch Zellen mit zwei maternalen Chromosomen 15. Des Weiteren sind in der Arbeit von Buiting *et al.* (2003) zwei PWS-Patienten mit einem Imprinting-Defekt (PWS-ID) und einem somatischen Mosaik beschrieben. Während einer dieser beiden Patienten in der MS-PCR ein verschobenes Methylierungsmuster zeigt, was auf eine Mosaiksituation hinweist, konnte ein verschobenes Muster bei dem zweiten Patienten auch in der Southern-Blot-Analyse an allen untersuchten Loci in 15q11-q13 nachgewiesen werden (Karin Buiting, persönliche Mitteilung). Außer einigen weiteren Patienten mit einer Deletion (Mowery-Rushton *et al.*, 1996; Chaddha *et al.*, 2003) sind keine Patienten mit einem somatischen Mosaik bekannt. Im nächsten Abschnitt wird die Methylierungsuntersuchung eines PWS-ID-Patienten, der im Blut neben normalen Zellen auch Zellen mit einem Imprinting-Defekt hat (Wey *et al.*, 2004) beschrieben.

3.2.1 Quantitative Analyse

Die DNA der PWS-ID-Patientin mit somatischem Mosaik und die ihres Vaters wurde uns von Dr. Alessandra Baumer (Zürich) zur Überprüfung ihrer eigenen mittels der MSP/DHPLC-Methode (methylation-specific PCR/high-performance liquid chromatography) ermittelten Ergebnisse geschickt. Die DNA zweier weiterer PWS-Patienten, die in der HPLC-Analyse eine auffällige Methylierung zeigten und einer PWS-Patientin mit einer maternalen uniparentalen Disomie (upd(15)mat) und einer invertierten Duplikation 15 (invdup 15) in 8% der Blutzellen (Baumer *et al.*, 2001) wurde ebenfalls mit untersucht. Die quantitative Analyse der Blut-DNA wurde genauso durchgeführt wie in 3.1.4 beschrieben. Der Grad der Methylierung wurde mit Hilfe der Formel für die Standardkurve in Abb. 3.4 ermittelt.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.8 zusammengefasst. Im Mosaik-Patienten liegen 73% aller Allele methyliert vor. Umgerechnet bedeutet das, 46% der Zellen haben einen Imprinting-Defekt, während 54% der Zellen normal methyliert vorliegen. In den Normalpersonen (NP 1, NP 2 und NP 3) sind im Durchschnitt 50% der Allele und somit 100% der Zellen normal methyliert. Auch der Vater der Patientin und die beiden PWS-Patienten mit der auffälligen Methylierung in der MSP/HPLC-Analyse (PWS 1 und PWS 2) zeigten eine Methylierung von 50% und erwiesen sich als normal. Bei der PWS-Patientin mit upd(15)mat und einer invdup 15 konnte eine 90%ige Methylierung festgestellt werden. Das bedeutet, 10% ihrer Blutzellen besitzen ein methyliertes maternales Allel und ein unmethyliertes paternales Allel mit einer invertierten Duplikation. Dieses Ergebnis kommt dem Ergebnis in der Publikation von Baumer *et al.* (2001) sehr nahe. Als Kontrollen wurden außerdem ein PWS-Patient (PWS DEL) und ein AS-Patient (AS DEL) mit einer großen Deletion mitgeführt. In der PWS-Kontrolle liegen alle Allele methyliert und in der AS-Kontrolle alle Allele unmethyliert vor.

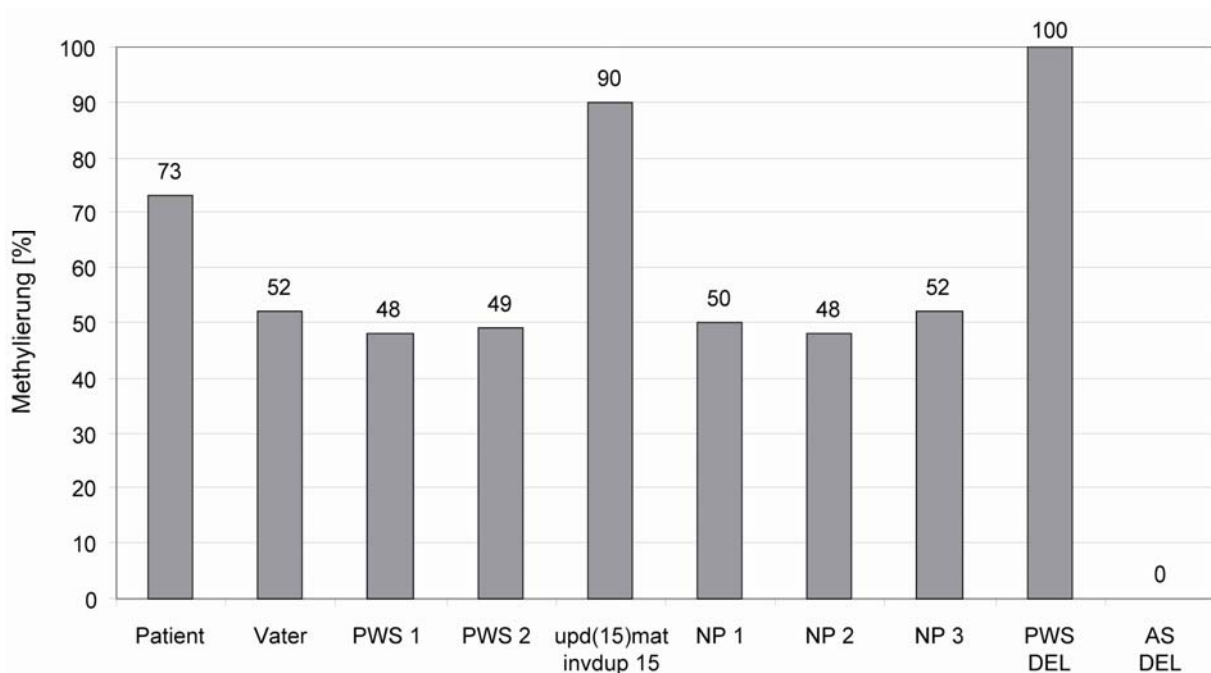


Abb. 3.8: Diagramm der Methylierung in den einzelnen Patienten und drei Normalpersonen (NP 1, NP 2 und NP 3). Als weitere Kontrollen wurde die DNA eines PWS- und eines AS-Patienten mit einer großen Deletion mitgeführt.

3.3 Suche nach strukturellen Veränderungen bzw. Deletionen der snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13

Das paternal exprimierte *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense-Transkript startet im IC und dient als Wirtsgen für kleine RNA-Gene. Die snoRNAs liegen entweder als Einzelgenkopie (*HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A*) oder als Multigen-Cluster mit 27 Genkopien (*HBII-85*) bzw. 47 Genkopien (*HBII-52*) vor (siehe Abb. 3.9 A). Sie liegen in Introns des *SNURF-SNRPN*-Transkripts und werden durch den Spleißprozess freigesetzt. Mäuse mit einer paternalen Deletion der Region von *Snurf-Snrpn* bis *Ube3a* (siehe Abb. 3.9 B) zeigen einen PWS-ähnlichen Phänotyp. Sie sind klein, hypoton und 80% der Nachkommen sterben bald nach der Geburt (Tsai *et al.*, 1999a; Chamberlain *et al.*, 2004). Überlebende Mäuse sind fertil und nicht übergewichtig. Hingegen führt eine Deletion der Region von *Ipw* bis einschließlich *Ube3a* zu keinem auffälligen Phänotyp (Nicholls, 1999; Tsai *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2005). Zwischen *SNURF-SNRPN* Exon 12 und den *IPW*-Exons (*SNURF-SNRPN*-Exons 59-61) befinden sich beim Menschen die snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A*, und das snoRNA-Gencluster *HBII-85*. In den letzten Jahren wurden insgesamt sechs Patienten mit einer balancierten Translokation publiziert, bei denen der Translokationsbruchpunkt im *SNURF-SNRPN*-Transkript liegt und somit das Transkript zerreißt. In zwei dieser Patienten liegen die Bruchpunkte im Intron 2 (Sun *et al.*, 1996; Kuslich *et al.*, 1999), in drei Patienten im Intron 20 (Schulze *et al.*, 1996; Conroy *et al.*, 1997 und Wirth *et al.*, 2001) und einem Patienten im Intron 17 (Schüle *et al.*, 2005) des *SNURF-SNRPN*-Transkripts (vertikale Pfeile in der Abb. 3.9 A). Alle diese Patienten haben einen PWS-ähnlichen Phänotyp. Bei drei dieser Patienten konnte ein Verlust der *HBII-85*-Expression nachgewiesen werden (Wirth *et al.*, 2001, Schüle *et al.*, 2005, Gallagher *et al.*, 2002). Das lässt vermuten, dass bei Patienten mit Teil-Symptomen für PWS das snoRNA Gencluster *HBII-85* eine wichtige Rolle spielt. Auch die snoRNAs proximal von *HBII-85* sind mögliche Kandidatengene für einen PWS-Phänotyp. Daher wurden folgende Patientengruppen mit unterschiedlichen Methoden auf strukturelle Veränderungen bzw. Deletionen dieser snoRNA-Gene hin untersucht: 14 Patienten mit einem PWS-ähnlichen Phänotyp; 90 konsekutive Patienten mit Verdacht auf PWS, die in der MS-PCR eine normale Methylierung zeigten und mental retardiert und übergewichtig sind; 33 ebenfalls konsekutive Patienten mit Verdacht auf PWS, einer normalen Methylierung, mentaler Retardierung, Übergewicht und zusätzlich einem geringen Geburtsgewicht (< -2 Standardabweichung); 146 Patienten mit einer konstitutionellen Entwicklungsverzögerung (Kleinwuchs).

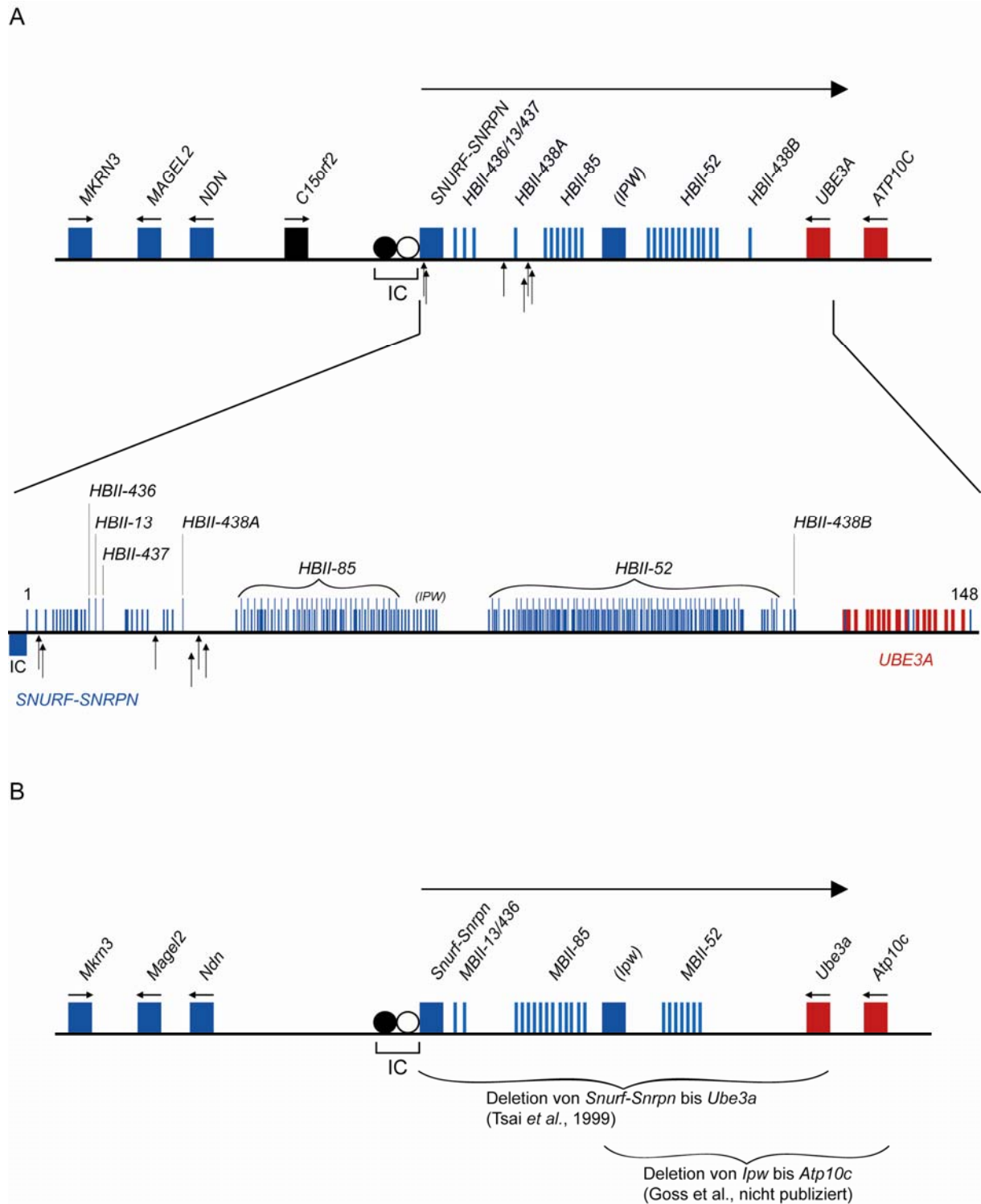


Abb. 3.9: Übersicht über die Region **A**. Chromosomale Region 15q11-q13 beim Menschen **B**. Orthologe Region auf Mauschromosom 7C. Paternal exprimierte Gene sind blau, maternal exprimierte Gene sind rot dargestellt. Das biallelisch exprimierte Gen *C15orf2* ist in schwarz dargestellt. *SNURF-SNRPN* Exons sind als kurze blaue Striche und die snoRNA-Genkopien als längere blaue Striche dargestellt. Die zwei Kreise stellen das Imprinting-Center (IC) dar. Horizontale Pfeile weisen auf die Transkriptionsrichtung hin. Mit vertikalen Pfeilen sind Translokationsbruchpunkte gekennzeichnet.

3.3.1 Analyse des *HBII-85*-Genclusters mittels Southern-Blot und MAPH (Multiplex Amplifiable Probe Hybridization)

Um herauszufinden, ob eine strukturelle Aberration oder eine Deletion des snoRNA-Genclusters *HBII-85* vorliegt, wurden zunächst die 14 Patienten mit einem PWS-ähnlichen Phänotyp mittels Southern-Blot-Analyse untersucht. Mit Hilfe des Programms DNASTar *MapDraw* (Lasergene) wurden fünf Restriktionsenzyme ausgewählt, die in dieser Region häufig schneiden. Für jedes dieser Enzyme wurde ein Southern-Blot mit der DNA der 14 Patienten und von Normalpersonen hergestellt. Als Hybridisierungssonde wurde die cDNA Probe IPWE4E3, die alle 27 Kopien von *HBII-85* überspannt, verwendet. Eine strukturelle Aberration würde man anhand einer Fragmentlängenveränderung erkennen, während eine Deletion zu einer Reduktion in der Intensität der Hybridisierungssonde führen würde. Bei allen 14 Patienten konnte jedoch beides ausgeschlossen werden (nicht gezeigt).

Da der Southern-Blot zu aufwendig ist, um eine größere Kohorte von Patienten nach Deletionen in dieser Region zu untersuchen, wurde die MAPH-Analyse (Multiplex Amplifiable Probe Hybridization) etabliert (Armour *et al.*, 2000; White *et al.*, 2002). Dieser Assay ermöglicht die Detektion von mehreren verschiedenen Loci innerhalb des 55 kb großen *HBII-85*-Genclusters mit einer einzelnen Hybridisierung. Dazu wurden neun unterschiedlich große PCR-Produkte (100–287 bp) aus dieser Region in einen Vektor kloniert und anschließend mit vektorspezifischen Primern amplifiziert (Abb. 3.10).

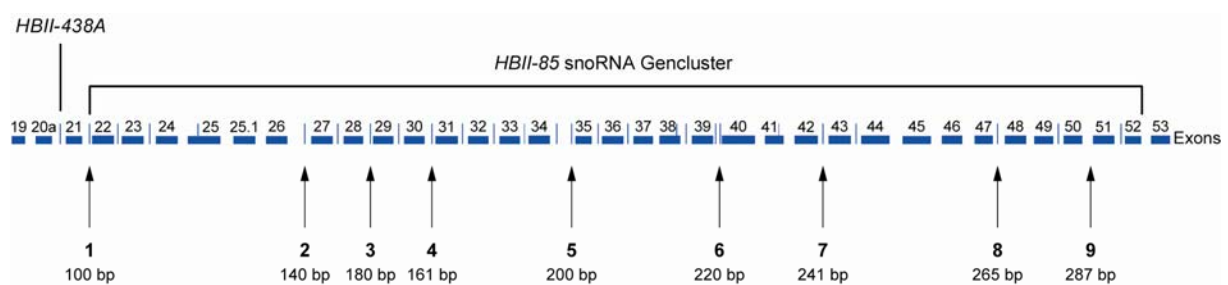


Abb. 3.10: Schematische Darstellung des *HBII-85*-Genclusters und der Lage der Sonden. Die Exons 19 bis 53 von *SNURF-SNRPN* sind als blaue Balken und die snoRNA Genkopien als blaue Striche dargestellt. Die Pfeile zeigen die Lage der Sonden und ihre Größen an.

Diese Sonden wurden mit einer Kontroll-Sonde aus der chromosomalen Region 8q24 zusammen auf die DNA der Patienten, die jeweils auf eine Nylon-Membran gespottet wurde hybridisiert. Nach stringentem Waschen wurden mit vektorspezifischen Primern, die

spezifisch bindenden Sonden amplifiziert und die PCR-Produkte mittels der Genescan-Software analysiert (Abb. 3.11).

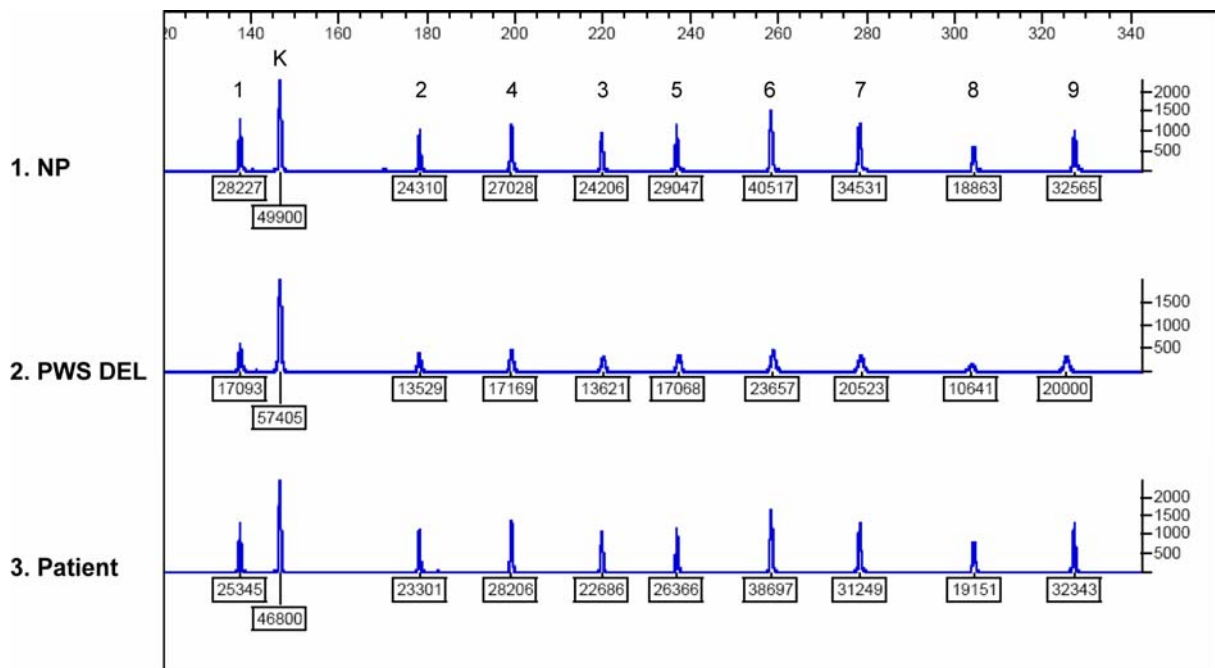


Abb. 3.11: Beispielhafte Darstellung der Genescan-Analyse eines Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp, einer Normalperson (NP) und eines PWS-Patienten mit einer großen Deletion (PWS DEL), die mit der MAPH-Methode analysiert wurden. Die Peakflächen sind unterhalb der Peaks angegeben. Die Sonden sind nach ihrer Größe, entsprechend der Abbildung 3.10 durchnummeriert. Da das Primerpaar 39 bp groß ist, sind die Fragmente ebenfalls um 39 bp länger als in Abbildung 3.10. Der zweite Peak gehört zur Kontroll-Sonde aus der chromosomalen Region 8q24 (K).

Jeder Peak steht für eine gebundene Sonde, während die Peakflächen die Dosis widerspiegeln. Um interne Schwankungen auszugleichen, wurde die Peakfläche jeder einzelnen Sonde (1-9) zunächst durch die Peakfläche der internen Kontroll-Sonde (K) geteilt. Die so normalisierten Peakflächen der Normalperson (NP) entsprechen 100%. Zuerst wurden 13 der 14 Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp, die zuvor mittels Southern-Blot untersucht wurden und die Kohorte von 90 konsekutiven Patienten mit Verdacht auf PWS, die in der MS-PCR eine normale Methylierung zeigten und mental retardiert und übergewichtig sind auf diese Weise analysiert. Ihre Peakareale betrugen im Verhältnis zu der Normalperson 70 bis über 100% (siehe Tabellen 3.3 und 3.4). Werte über 100% wurden auf 100% gesetzt. Die Deletionskontrolle (PWS DEL) zeigte Werte von etwa 50%.

Tabelle 3.3: Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp.

Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	M3025	118.6	115.4	130.3	107.9	114.2	121.2	105.8	100.7	98.5
2	M3349	125.5	126.3	141.9	121.8	118.4	124.4	101.1	88.7	83.0
3	M4419	126.3	124.6	144.9	119.8	117.8	118.8	101.9	79.8	75.8
4	M4965	117.4	117.0	132.0	113.1	116.4	116.2	92.3	94.8	83.0
5	M6068	113.2	131.4	103.1	117.2	117.7	127.1	82.6	127.1	110.3
6	M6455	138.4	129.2	137.0	125.3	117.0	112.9	92.6	83.0	77.2
7	M6863	113.2	131.4	103.1	117.2	117.7	12701	82.6	127.1	110.3
8	M7181	118.2	110.9	126.4	113.1	111.7	114.4	101.5	93.8	84.9
9	M8559	97.1	102.9	125.0	104.7	101.5	112.5	106.5	110.4	93.5
10	M12470	130.9	113.2	128.0	108.9	108.6	106.6	89.7	83.4	76.2
11	M22800	113.2	85.5	144.8	154.7	146.4	104.2	90.9	175.6	160.5
12	M22865	106.5	108.9	116.2	101.9	101.2	99.5	99.6	105.6	94.8
13	M22936	131.2	123.6	151.4	125.9	125.0	131.7	104.2	95.6	90.4

Tabelle 3.4: Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht.

Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	M12740	115.8	107.5	113.9	102.7	97.9	89.9	85.4	91.9	78.5
2	M16131	93.0	81.9	77.2	86.7	82.1	85.0	71.0	106.1	107.4
3	M16133	87.9	93.5	104.9	96.8	101.1	102.0	95.6	99.1	100.5
4	M16984	119.1	115.9	116.8	117.0	120.0	115.1	99.8	124.3	109.1
5	M17156	130.5	117.2	124.4	114.6	121.0	117.8	98.7	112.0	101.9
6	M17158	109.3	101.2	107.5	108.5	108.8	111.6	100.7	115.2	110.5
7	M17163	115.2	121.6	119.5	112.1	114.6	112.5	110.1	103.2	113.0
8	M17164	119.9	114.2	115.9	113.6	114.7	109.5	106.7	113.8	126.4
9	M17166	109.3	105.0	109.6	106.6	107.2	108.9	98.3	104.4	99.7
10	M17167	110.5	106.7	105.6	106.1	107.9	102.7	99.2	101.4	103.5
11	M17168	109.9	112.9	124.6	111.7	115.9	116.0	102.8	115.4	107.1
12	M17169	95.8	90.1	92.1	92.6	96.0	97.7	91.0	102.1	100.9
13	M17170	108.0	108.0	115.7	107.9	106.4	111.0	95.5	109.3	99.1
14	M17171	118.9	118.4	114.9	121.8	125.2	118.3	101.7	126.8	110.5
15	M17298	104.1	107.8	109.4	104.5	109.9	110.3	97.1	115.6	104.3
16	M17301	113.3	115.4	118.3	117.1	118.0	113.0	102.2	124.6	109.6
17	M17304	101.4	105.7	91.9	106.8	92.5	88.2	81.3	98.8	82.3
18	M17879	101.2	108.6	110.2	109.0	109.8	108.7	95.1	121.3	106.0
19	M17951	93.0	93.4	96.0	97.4	106.5	100.0	97.2	106.8	106.8
20	M18050	123.5	120.9	115.7	123.7	130.0	123.6	107.5	135.2	118.9
21	M18053	95.5	98.1	98.8	102.0	103.5	99.3	97.2	97.7	102.5
22	M18054	123.9	121.6	129.4	122.3	133.4	125.0	109.3	127.2	112.1
23	M18055	119.2	132.4	121.4	134.1	151.1	139.8	131.4	181.2	171.7
24	M18056	110.2	119.3	99.2	107.6	124.0	113.8	113.3	132.4	133.4
25	M18057	115.4	119.1	103.9	112.5	128.7	119.3	118.9	148.7	144.7
26	M18081	98.1	101.4	100.7	101.9	117.3	113.9	101.7	128.9	128.1
27	M18082	130.0	128.3	132.8	132.8	126.2	128.2	125.6	129.5	119.8

Tabelle 3.4 (Fortsetzung): Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht.

Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
28	M18083	129.2	137.1	130.2	132.4	144.5	137.0	130.0	164.1	176.4
29	M18086	129.4	133.6	128.6	130.6	148.5	138.8	139.2	143.4	159.2
30	M18089	121.7	12.4	123.0	122.0	141.8	122.3	126.1	130.8	145.0
31	M18090	116.2	118.2	112.3	113.2	127.8	115.2	116.8	125.4	129.2
32	M18091	122.9	130.2	131.6	127.5	143.9	132.3	132.6	133.2	142.0
33	M18333	106.2	108.8	110.1	106.8	118.3	115.5	114.6	122.0	119.1
34	M18339	106.2	108.3	109.7	104.9	122.1	119.2	109.3	119.8	126.0
35	M18340	114.0	112.9	112.9	102.1	123.2	115.2	112.0	132.5	150.2
36	M18343	119.1	128.6	138.5	122.5	137.1	135.6	125.4	152.8	146.3
37	M18344	108.0	107.4	113.1	101.0	115.7	111.5	111.2	135.3	135.7
38	M18346	103.9	106.2	103.3	97.0	120.6	109.0	105.3	120.8	127.0
39	M18347	105.1	108.3	101.7	104.7	117.2	102.9	112.1	127.2	134.4
40	M18348	102.6	106.7	110.2	104.2	112.8	110.7	101.7	123.6	111.7
41	M18349	101.1	100.7	106.1	95.8	108.9	106.4	105.6	114.9	114.8
42	M18350	109.8	106.1	103.5	118.5	107.1	108.8	118.0	114.9	103.1
43	M18351	117.3	100.8	107.2	119.2	101.2	109.5	116.3	115.7	101.6
44	M18352	103.7	103.3	113.8	110.3	108.2	114.6	121.4	98.9	106.5
45	M18354	110.3	111.8	114.8	122.4	113.8	129.0	129.2	135.6	115.3
46	M18355	98.8	90.9	102.7	110.6	103.5	114.9	116.3	120.9	105.8
47	M18367	104.7	126.7	97.7	107.2	95.1	93.2	108.1	100.9	92.7
48	M18510	106.3	103.8	116.3	120.6	110.6	119.0	119.6	122.4	107.8
49	M18511	103.1	94.5	102.9	111.1	93.3	114.0	108.4	111.3	98.0
50	M18628	130.3	134.4	134.2	133.5	124.5	143.4	127.1	131.1	120.8
51	M18629	114.2	118.5	126.8	120.9	120.4	137.2	131.3	127.8	105.6
52	M18722	122.8	121.2	120.7	131.3	130.6	151.0	128.6	149.4	125.3
53	M18723	119.2	116.7	130.9	123.5	124.9	142.0	130.2	124.2	114.5
54	M18724	101.3	96.9	99.5	111.9	103.5	112.1	100.0	106.7	101.3
55	M18725	109.5	102.6	111.9	119.0	108.9	125.6	117.8	123.8	106.5
56	M18726	120.6	113.6	124.0	128.3	122.7	136.5	124.7	126.3	115.4
57	M18728	105.0	98.9	110.2	116.4	114.6	121.6	101.6	108.9	101.5
58	M18729	116.2	106.3	115.6	117.5	115.0	124.1	119.2	118.6	107.4
59	M18731	122.4	116.0	134.7	139.1	130.3	160.2	133.9	167.2	138.0
60	M18732	113.7	109.9	109.5	117.4	106.7	119.0	115.3	115.6	99.0
61	M18806	112.8	106.8	115.8	114.0	106.8	124.8	116.7	120.5	105.9
62	M18807	110.1	110.3	96.3	123.1	123.9	112.2	103.1	123.9	110.4
63	M18808	85.8	97.8	86.8	115.2	107.6	106.2	100.1	127.9	110.9
64	M18809	102.5	99.7	104.7	120.3	120.8	120.7	109.4	124.1	105.1
65	M18814	87.2	82.5	86.4	106.4	104.7	106.5	90.9	116.5	99.5
66	M18880	96.1	97.3	91.7	108.9	102.4	100.5	90.9	95.6	80.2
67	M18881	104	111.9	105.3	120.2	121.5	117.4	106.2	112.5	91.9
68	M18882	96.7	96.1	96.5	119.3	118.2	116.1	98.1	118.7	94.2
69	M18883	103.9	100.9	94.8	114.8	101.5	106.5	90.7	107.3	95.8
70	M19014	87.0	77.6	92.9	110.6	101.6	105.7	98.5	112.0	95.9
71	M19015	97.5	119.0	122.3	136.9	123.8	134.9	108.3	106.6	93.5
72	M19018	94.9	86.6	115.3	125.6	127.7	128.4	114.0	126.9	112.0
73	M19042	125.6	125.1	147.5	155.5	155.5	153.4	128.4	158.5	124.9
74	M19251	99.3	103.8	93.8	94.9	109.0	101.3	101.6	120.6	108.8
75	M19332	91.7	88.8	96.2	105.0	113.3	111.4	94.4	115.2	94.9
76	M19333	93.6	91.7	111.1	113.9	108.9	116.7	97.0	115.8	104.0

Tabelle 3.4 (Fortsetzung): Ergebnis der MAPH-Analyse für Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht.

Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
77	M19338	87.6	84.3	95.5	107.2	102.1	112.4	95.9	109.6	94.9
78	M19339	82.0	84.6	96.3	102.0	98.6	109.4	87.1	104.2	90.9
79	M19340	104.5	117.0	115.9	124.1	126.5	124.9	111.5	124.9	107.8
80	M19342	106.0	114.1	109.3	103.7	109.5	102.1	96.0	114.2	100.2
81	M19343	92.9	94.8	96.0	118.8	113.8	117.9	95.4	130.7	98.6
82	M19464	101.7	97.3	91.6	98.6	99.0	104.4	96.8	92.7	97.1
83	M19467	98.1	96.2	88.1	95.2	97.8	102.1	103.8	92.2	95.8
84	M19470	96.4	105.6	87.5	103.1	101.0	105.9	105.6	97.6	95.6
85	M19624	103.0	112.1	103.2	106.3	105.0	117.6	103.6	112.1	109.3
86	M19718	105.4	99.5	81.3	95.5	88.9	88.3	97.0	88.0	99.8
87	M19719	85.7	81.8	75.5	86.8	92.7	92.8	106.1	90.2	99.2
88	M19720	96.8	96.5	80.5	96.4	86.5	89.9	100.0	86.5	95.5
89	M19721	99.9	78.8	85.3	91.2	94.9	85.0	104.5	83.5	103.4
90	M19726	95.9	93.7	95.9	96.0	109.1	104.5	106.3	96.1	101.3
PWS DEL		49.0	44.4	56.5	50.4	56.3	57.1	49.8	50.6	51.8

Da Mäuse mit einer paternalen Deletion der hier untersuchten Region extrem wachstumsretardiert sind und ein reduziertes Körpergewicht im Vergleich zu Geschwistertieren aus dem gleichen Wurf haben, wurden 146 Patienten mit Kleinwuchs (Tabelle 3.5) und 33 Patienten mit einem geringen Geburtsgewicht (Tabelle 3.6) ebenfalls mit MAPH analysiert. Auch bei diesen Patienten konnte keine Deletion im *HBII-85*-Gencluster gefunden werden (siehe Tabellen 3.5 und 3.6). In einigen Fällen wurden Werte unter 70% gemessen (fett gedruckte Werte in Tabellen 3.5 und 3.6). Da der gesamte Lauf bei diesen Patienten etwas niedriger erschien als bei den anderen Patienten, wurden diese nicht als Deletion bewertet. Die Peakflächen der Deletionskontrolle zeigten im Verhältnis zur Normalperson Werte von etwa 50-60%. Somit kann man eine Deletion im *HBII-85*-Gencluster als Grund für die hier vorliegende mentale Retardierung, den Kleinwuchs und das geringe Geburtsgewicht ausschließen.

Tabelle 3.5: Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit Kleinwuchs.

Patienten mit Kleinwuchs		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	P1	106.3	109.1	107.0	95.8	87.4	92.5	77.3	111.4	107.6
2	P2	118.6	123.5	118.9	110.9	119.3	114.8	101.9	130.3	108.5
3	P3	104.8	121.2	134.9	98.8	105.0	105.5	99.7	113.1	120.0
4	P4	103.5	103.4	129.6	93.9	92.8	102.9	88.5	73.0	76.0
5	P5	101.7	104.9	154.6	99.3	113.9	99.0	121.3	97.3	122.4
6	P6	118.2	136.0	146.7	123.0	128.9	137.2	127.5	141.0	143.1
7	P7	111.0	118.8	111.0	104.4	113.0	107.9	102.1	122.3	114.2
8	P8	106.4	108.9	151.7	112.3	129.8	114.8	119.3	103.7	135.0
9	P9	112.1	122.6	145.4	112.7	125.8	109.9	122.8	126.8	149.4
10	P10	108.1	102.8	160.5	103.6	112.8	116.6	115.5	117.5	145.3
11	P11	114.6	114.5	137.2	109.7	118.8	116.2	112.9	119.8	123.9
12	P12	114.3	111.2	180.0	112.9	137.5	128.2	141.1	108.9	143.4
13	P13	121.2	134.9	203.6	122.9	137.7	139.0	127.6	127.3	134.9
14	P14	125.6	132.7	181.0	128.8	131.7	119.2	94.6	82.0	78.1
15	P15	107.5	125.2	167.8	118.4	120.9	128.1	98.5	103.2	94.6
16	P16	126.3	135.6	199.0	121.0	132.2	136.1	117.3	118.0	120.3
17	P17	86.9	97.1	116.2	111.6	123.6	118.3	106.6	128.5	111.7
18	P18	127.3	147.8	186.8	120.9	126.8	130.4	116.4	141.8	130.1
19	P19	118.6	119.5	208.5	112.8	137.9	117.0	125.6	103.5	114.7
20	P20	118.2	140.1	181.9	112.8	124.8	132.8	109.5	141.0	148.2
21	P21	103.2	105.2	90.6	100.3	113.5	105.5	103.3	121.4	115.2
22	P22	121.6	124.4	202.0	114.2	133.6	127.5	122.2	124.4	144.4
23	P23	111.3	115.3	167.9	109.7	126.2	115.2	126.2	116.3	124.3
24	P24	129.9	125.8	195.4	117.7	138.1	127.3	128.9	131.5	157.6
25	P25	106.0	106.6	161.3	115.9	135.2	122.0	117.0	138.8	157.7
26	P26	104.2	99.3	147.3	97.2	112.4	100.0	108.6	109.5	131.6
27	P27	110.1	111.5	155.7	113.6	128.0	110.9	111.6	113.4	121.1
28	P28	102.0	113.5	144.7	106.8	115.6	109.6	110.8	107.8	104.8
29	P29	107.0	110.5	152.9	114.3	128.9	116.1	117.3	120.7	120.9
30	P30	107.5	107.5	178.9	106.2	129.6	113.8	122.8	117.7	130.5
31	P31	81.2	94.5	157.6	90.7	97.2	95.4	100.3	81.8	80.7
32	P32	104.2	110.6	146.6	99.7	116.8	107.7	106.8	118.7	130.9
33	P33	93.7	101.1	107.2	102.7	100.5	115.3	99.7	102.2	108.4
34	P34	97.8	105.3	128.4	98.8	110.3	102.7	104.1	99.6	101.0
35	P35	93.7	95.7	125.4	100.7	112.5	110.6	114.5	100.7	110.9
36	P36	102.7	105.2	151.9	107.7	117.3	122.4	119.8	121.2	129.2
37	P37	103.2	104.9	148.4	113.5	129.9	121.5	119.7	122.0	131.0
38	P38	107.3	109.6	170.8	108.9	113.8	112.7	98.8	118.0	109.2
39	P39	98.5	108.6	154.7	114.6	118.2	130.5	107.0	134.7	123.9
40	P40	101.5	103.8	120.1	110.4	108.5	109.8	90.4	104.2	93.1
41	P41	90.5	98.8	147.2	104.7	111.7	127.2	110.8	99.4	90.3
42	P42	112.0	110.0	177.7	116.3	141.6	120.6	133.8	117.5	133.2
43	P43	90.2	112.7	106.3	107.3	99.2	119.6	102.5	115.1	94.3
44	P44	100.4	103.3	151.3	106.1	116.0	127.7	112.6	115.1	106.5
45	P45	109.5	135.3	124.0	115.6	124.7	131.7	113.8	129.2	113.1
46	P46	107.8	112.5	102.2	102.8	111.0	108.5	101.3	120.5	108.3
47	P47	104.7	116.6	102.8	108.8	110.8	104.1	111.3	125.4	125.6
48	P48	102.8	107.8	101.6	111.8	116.3	110.8	104.8	127.6	115.4
49	P49	101.0	104.2	84.9	101.6	100.8	92.8	88.8	119.9	106.2

Tabelle 3.5 (Fortsetzung): Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit Kleinwuchs.

Patienten mit Kleinwuchs		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
49	P49	101.0	104.2	84.9	101.6	100.8	92.8	88.8	119.9	106.2
50	P50	105.9	117.3	101.6	101.6	107.2	99.8	83.2	139.0	126.1
51	P51	107.2	120.7	106.2	101.8	108.7	112.1	88.9	119.5	104.9
52	P52	109.5	109.7	99.5	97.7	107.0	97.9	92.3	121.9	108.2
53	P53	98.8	104.1	89.6	95.3	108.3	95.6	102.3	121.9	109.6
54	P54	104.1	111.0	109.1	99.6	108.7	106.1	102.7	124.0	114.2
55	P55	111.5	134.2	112.8	106.6	124.5	122.7	107.4	130.3	120.4
56	P56	110.0	116.4	97.7	105.4	115.0	108.6	110.1	132.5	120.1
57	P57	107.4	115.3	104.6	104.8	114.7	108.6	104.6	112.9	109.2
58	P58	103.8	107.7	84.5	99.0	103.4	99.6	100.6	120.5	113.3
59	P59	99.0	99.1	92.5	95.6	105.8	100.5	105.4	124.1	108.2
60	P60	104.5	106.5	100.4	100.2	113.6	112.1	114.8	122.5	109.0
61	P62	119.9	143.3	13.0	114.5	135.7	120.7	108.3	158.7	129.5
62	P63	104.9	110.3	112.4	102.7	112.6	123.0	110.2	114.9	113.0
63	P64	121.8	140.7	122.4	124.4	141.4	130.0	119.4	159.5	137.8
64	P65	118.3	135.9	111.3	119.9	131.8	117.3	115.6	129.9	121.2
65	P66	112.3	131.5	119.6	123.9	130.0	122.4	114.3	144.1	121.9
66	P67	113.6	129.0	122.2	113.6	126.3	125.7	117.6	148.5	122.1
67	P68	100.4	126.5	95.8	110.8	112.6	105.5	101.2	149.6	122.4
68	P69	104.6	110.4	96.6	105.1	115.6	107.3	99.9	120.9	107.8
69	P70	116.3	138.7	107.0	116.1	132.8	119.0	107.1	131.5	116.5
70	P71	110.1	124.7	104.0	113.0	119.5	105.6	108.0	132.0	113.6
71	P72	105.8	114.7	98.3	107.7	113.1	106.3	104.7	126.6	114.3
72	P73	109.1	114.5	92.0	109.0	120.8	104.0	100.4	132.3	111.0
73	P74	101.9	105.9	110.3	105.5	107.9	114.0	105.3	113.1	114.5
74	P75	109.6	119.5	103.5	105.6	114.1	112.5	102.8	141.8	130.9
75	P76	106.2	117.3	93.3	101.0	110.8	100.5	104.6	115.8	112.6
76	P78	90.3	105.5	115.3	101.9	103.9	105.8	99.1	101.8	99.9
77	P79	100.1	115.8	124.3	107.6	118.3	124.2	109.0	121.4	137.5
78	P80	103.6	107.6	121.2	105.2	114.1	120.7	105.6	107.1	108.5
79	P81	117.1	132.4	130.0	113.2	118.2	123.4	115.8	118.4	114.6
80	P82	107.1	105.0	113.0	99.1	107.0	106.5	101.1	90.9	92.3
81	P83	106.8	117.5	122.3	105.2	110.2	114.0	100.9	136.9	138.2
82	P84	102.7	102.2	117.1	94.3	104.1	107.9	97.4	91.9	88.1
83	P85	110.8	122.4	135.1	104.5	113.5	117.1	102.9	97.1	99.2
84	P86	104.1	107.1	126.8	96.7	110.4	112.4	103.5	106.8	101.6
85	P87	114.4	115.7	133.9	104.1	114.1	120.4	105.6	112.2	111.3
86	P88	99.5	101.7	110.1	94.8	104.5	112.2	100.4	102.6	100.1
87	P89	115.8	122.6	131.2	109.4	117.8	120.6	107.5	111.9	110.0
88	P90	108.3	95.8	110.9	97.8	96.3	94.9	95.2	105.1	100.6
89	P91	113.3	116.0	113.6	98.3	111.1	115.5	109.5	99.5	104.4
90	P92	101.5	100.8	110.2	92.4	101.5	104.3	101.8	94.7	103.6
91	P93	84.6	85.5	77.2	88.3	84.6	87.8	92.8	86.6	104.0
92	P94	92.0	98.4	108.0	98.0	107.7	117.1	111.3	110.5	128.7
93	P95	86.5	93.4	111.0	90.4	91.5	114.9	102.6	98.2	110.9
94	P96	88.9	97.4	108.2	93.3	95.3	112.0	102.4	102.7	114.7
95	P97	98.8	92.4	108.1	92.2	98.3	112.5	103.8	95.3	107.0
96	P98	81.0	85.0	94.8	86.0	85.5	101.3	97.8	91.3	106.2
97	P99	101.9	104.1	107.9	95.5	98.7	111.9	102.5	91.0	102.4
98	P100	84.2	91.0	101.6	89.2	92.6	106.7	97.6	91.5	107.5
99	P101	96.4	97.3	108.9	93.9	102.9	113.1	103.6	104.2	113.9

Tabelle 3.5 (Fortsetzung): Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit Kleinwuchs.

Patienten mit Kleinwuchs		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
98	P100	84.2	91.0	101.6	89.2	92.6	106.7	97.6	91.5	107.5
99	P101	96.4	97.3	108.9	93.9	102.9	113.1	103.6	104.2	113.9
100	P102	90.6	95.9	96.8	94.4	95.9	109.1	103.4	94.9	103.9
101	P103	98.9	102.7	116.7	100.0	104.1	114.5	113.7	105.0	117.3
102	P104	93.0	93.8	99.0	96.4	94.6	104.1	101.6	96.4	100.5
103	P105	88.1	88.7	101.4	95.8	100.7	116.6	105.1	96.2	115.8
104	P106	85.1	86.8	63.1	83.5	74.1	90.1	88.0	83.4	99.8
105	P107	83.5	72.7	86.5	90.1	78.5	91.2	96.9	86.3	103.1
106	P108	88.4	87.1	98.2	87.1	93.4	102.5	103.0	93.0	110.1
107	P109	86.7	86.2	100.0	86.4	89.6	102.3	97.7	88.4	109.3
108	P110	86.0	81.5	94.2	83.2	82.2	97.8	97.5	89.4	105.0
109	P111	79.3	79.5	97.8	80.4	86.4	99.7	97.2	91.0	114.5
110	P112	82.4	70.6	78.6	73.2	74.0	83.4	80.2	79.6	96.6
111	P113	87.4	91.9	96.4	98.1	93.9	10.6	105.6	93.3	121.0
112	P114	87.2	91.7	104.7	91.8	95.8	109.3	105.6	89.1	109.3
113	P115	86.3	87.5	96.9	88.3	96.3	91.4	84.5	65.1	78.3
114	P116	98.3	99.4	99.3	98.8	108.6	101.4	103.1	101.0	104.7
115	P117	98.8	97.6	105.0	104.2	101.1	106.2	109.5	103.4	108.8
116	P118	110.4	113.0	112.8	114.5	105.6	100.3	97.5	111.1	100.6
117	P119	98.5	105.1	100.2	96.4	100.9	97.0	93.2	93.0	87.1
118	P121	89.0	100.2	107.8	104.0	101.2	105.4	107.5	97.8	98.7
119	P122	114.4	117.0	99.5	106.3	11.8	95.4	91.8	100.9	95.8
120	P123	102.1	108.9	112.1	105.9	102.7	96.5	88.8	106.0	100.8
121	P124	96.0	104.8	101.0	104.7	108.5	101.6	102.1	99.8	101.1
122	P126	122.1	144.3	127.6	113.9	115.5	107.2	86.5	112.2	93.1
123	P127	111.5	110.7	109.0	102.6	105.4	102.3	100.8	79.0	120.3
124	P128	118.2	121.7	116.6	107.5	103.8	105.4	99.5	78.3	118.5
125	P129	100.7	106.4	108.9	110.9	95.9	94.2	79.7	104.4	93.5
126	P130	105.0	102.1	98.0	101.4	92.9	81.3	82.3	81.2	83.9
127	P131	105.7	122.4	120.6	113.5	111.1	102.4	90.7	107.1	100.1
128	P132	127.5	132.0	118.9	115.8	113.8	103.1	98.2	112.0	94.6
129	P133	122.4	136.6	127.4	123.3	125.2	114.5	99.2	118.6	107.6
130	P134	113.4	126.1	113.7	109.8	104.3	94.8	85.3	107.0	91.3
131	P135	121.7	115.6	113.9	108.1	100.9	96.8	97.11	78.9	117.7
132	P136	101.0	110.1	110.5	105.6	105.5	105.6	89.7	113.9	101.2
133	P137	104.9	122.9	118.7	102.5	105.3	98.7	79.9	102.9	82.8
134	P138	98.0	98.6	88.3	96.7	90.1	88.9	74.9	97.6	90.6
135	P139	102.6	112.3	107.7	99.4	92.3	91.2	89.9	71.0	103.2
136	P140	94.1	96.8	94.1	99.9	100.4	93.7	80.5	94.5	89.8
137	P141	107.0	119.1	118.6	103.0	122.8	109.8	108.2	114.2	112.0
138	P142	110.9	124.1	110.1	112.0	116.6	109.6	94.3	108.9	111.4
139	P143	108.6	104.6	103.3	105.3	99.6	94.8	88.8	100.6	88.8
140	P144	101.1	107.0	106.7	107.4	107.4	99.3	94.4	119.1	114.3
141	P145	102.1	112.0	109.8	107.6	111.3	103.1	90.6	120.6	112.8
142	P146	100.8	118.9	117.0	109.7	116.4	113.2	100.1	128.7	114.7
143	P147	92.6	89.3	91.4	90.4	91.1	90.5	89.1	90.2	87.1
144	P148	110.7	104.4	111.3	108.3	126.3	116.5	107.2	113.1	102.6
145	P149	112.8	138.1	129.1	126.7	131.2	130.0	102.8	155.5	125.2
146	P150	93.0	97.7	100.0	96.2	90.9	102.7	101.6	94.5	96.1
PWS DEL		59.2	57.6	49.5	49.8	54.8	53.3	54.9	46.7	51.8

Tabelle 3.6: Ergebnis der MAPH-Analyse der Patienten mit mentaler Retardierung, Übergewicht und geringem Geburtsgewicht.

Patienten mit geringem Geburtsgewicht		MAPH-Sonden								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	M1545	100.9	95.5	97.6	101.1	100.2	102.6	103.8	100.1	103.1
2	M1564	108.0	106.2	96.7	111.7	110.3	94.4	106.2	77.0	112.9
3	M1656	96.8	105.4	99.9	106.4	101.6	98.5	112.0	75.0	104.9
4	M1682	108.0	112.4	110.1	105.2	112.8	103.8	102.3	96.0	101.6
5	M1999	106.2	110.8	105.8	100.8	98.2	98.2	92.2	93.7	91.7
6	M2008	110.5	124.7	106.6	104.8	111.5	104.4	97.1	94.2	96.6
7	M2009	117.3	109.9	96.1	104.0	101.1	92.3	98.0	77.8	122.6
8	M2231	117.7	112.0	108.5	111.6	105.7	102.3	89.9	83.6	106.9
9	M2232	109.0	109.6	107.5	104.1	104.6	105.2	96.9	77.5	109.2
10	M2619	140.1	141.1	114.1	116.7	118.4	104.9	114.7	72.9	129.4
11	M2690	106.9	121.0	93.9	106.2	113.7	102.8	95.9	94.6	103.9
12	M2695	100.8	95.8	107.2	116.7	112.7	108.4	108.6	88.7	124.6
13	M2995	105.2	103.8	103.5	103.5	98.0	102.8	102.9	81.5	123.4
14	M2999	92.9	87.5	87.1	93.5	86.6	88.3	91.6	69.2	102.7
15	M3013	92.6	91.1	96.0	102.1	107.1	100.1	104.6	75.7	103.5
16	M3177	126.0	123.6	114.1	112.3	115.2	105.7	105.6	75.8	104.4
17	M3232	105.3	117.4	106.9	106.0	110.0	105.0	100.5	76.2	109.1
18	M3388	114.6	117.3	110.1	110.7	109.5	109.3	104.6	77.7	107.4
19	M3497	103.4	106.0	101.6	101.3	101.9	99.5	94.0	75.9	104.0
20	M3500	119.3	119.9	123.8	116.9	115.7	113.6	105.9	88.9	120.4
21	M3541	104.9	105.7	98.4	93.3	99.1	100.0	103.2	91.4	87.0
22	M3661	98.7	96.6	91.6	95.6	102.3	96.8	90.2	94.3	98.3
23	M3787	99.4	97.4	103.3	92.5	106.5	101.6	99.2	95.4	98.0
24	M4053	112.3	100.1	101.1	104.9	104.5	97.5	95.7	95.0	99.3
25	M4246	103.7	103.1	104.0	106.5	102.9	100.4	96.6	80.2	108.5
26	M4677	111.5	117.8	108.7	103.8	122.4	110.9	108.4	94.4	98.2
27	M4964	108.5	116.2	112.1	104.3	120.9	115.3	103.6	117.1	113.2
28	M4974	146.1	155.9	131.1	123.8	141.1	108.0	131.0	80.4	96.3
29	M5074	120.2	115.4	118.9	112.4	110.4	108.2	103.3	78.7	110.5
30	M5076	108.7	114.1	106.8	102.4	117.0	105.1	100.9	103.0	113.4
31	M5090	102.0	109.5	103.4	92.2	94.1	98.8	96.5	67.8	97.0
32	M5432	103.2	113.2	108.0	101.2	102.9	109.2	89.9	75.9	96.5
33	M6260	100.3	94.9	93.4	108.6	113.3	106.7	123.8	78.8	132.0
PWS DEL		53.3	47.3	51.2	49.8	48.9	52.1	50.1	48.5	51.8

3.3.2 Analyse der snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436* und *HBII-437* mittels der Realtime-PCR

Das Deletionsscreening der snoRNAs *HBII-13*, *HBII-436* und *HBII-437* wurde in 33 Patienten mit geringem Geburtsgewicht und in den 14 Patienten, mit einem PWS-ähnlichen Phänotyp mit der Realtime-PCR (TaqMan) durchgeführt. Für jedes snoRNA-Gen wurden zwei spezifische Primer und eine spezifische FAM-markierte MGB TaqMan[®]-Sonde ausgesucht. Als interne Kontrolle diente der Retinoblastom-Locus (RB-Locus) auf Chromosom 13. Auch für diesen Locus wurden spezifische Primer und eine VIC-markierte Sonde ausgesucht. Für jede untersuchte DNA wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Um später die Dosis der einzelnen Loci miteinander vergleichen zu können, wurde eine Standardkurve für das jeweilige snoRNA-Gen und eine für den Retinoblastom-Locus mit einer Kontroll-DNA in unterschiedlichen Verdünnungen (250ng, 125 ng, 50 ng, 25 ng und 12.5 ng) erstellt und bei jeder PCR mitgeführt. Die Menge der PCR-Produkte für die beiden Sonden wurde mit Hilfe der Standardkurven und dem ABIprism[®] 3100 Genetic Analyzer automatisch ermittelt. Der Wert der einzelnen snoRNA-Gene wurde durch den Wert des RB-Locus geteilt. Da immer dieselbe Menge an DNA (50 ng) in die PCR eingesetzt wurde, lag dieses Verhältnis bei Normalpersonen ungefähr bei eins (0.8-1.2). Auch bei den Patienten, die mittels Realtime-PCR auf Deletionen der snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436* und *HBII-437* hin untersucht wurden, lagen die Werte zwischen 0.8 und 1.2 (siehe Tabelle 3.7). Eine mitgeführte Deletionskontrolle (PWS DEL) zeigte stets einen Wert um 0.5 (siehe Tabelle 3.7). Diese snoRNA-Gene sind demnach ebenfalls nicht der Grund für mentale Retardierung und das geringe Geburtsgewicht.

Tabelle 3.7: Ergebnis des Deletionsscreenings der snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436* und *HBII-437*.

Patienten mit	<i>HBII-13</i>	<i>HBII-436</i>	<i>HBII-437</i>
geringem Geburtsgewicht			
M1545	0.9	1.2	1.1
M1564	1	1.1	1
M1656	1.1	1.1	1
M1682	1	1.1	1.1
M1999	1	1.1	1.2
M2008	1	1.1	1.2
M2009	1	1.2	1
M2231	1	1	0.9
M2232	1	1	1
M2522	1	1.1	1
M2619	1	1	0.9
M2695	1	0.9	1.2
M2995	1	1	0.9
M2999	0.8	0.9	1.1
M3013	0.8	0.9	1
M3177	0.9	1.1	0.9
M3232	0.9	1.1	0.9
M3388	0.9	1	0.8
M3497	1	1.1	1
M3500	0.9	1	1
M3541	0.9	0.9	0.8
M3661	0.9	1	1
M3787	0.8	0.9	0.8
M4053	0.8	0.9	1.1
M4246	0.9	1	0.9
M4677	0.8	1.1	0.9
M4964	0.8	1	0.9
M5074	0.9	1	0.9
M5076	0.8	1	0.8
M5090	0.9	0.9	1.1
M5432	0.9	0.8	0.8
M5549	0.8	0.8	0.9
M6260	0.8	1	1
PWS-ähnlichem Phänotyp			
M12470	1.1	0.9	0.9
M12888	0.9	0.9	0.9
M22800	1	0.8	0.9
M22865	1	0.9	1.1
M22936	1.1	1.2	0.9
M3025	1.1	1.1	1
M3349	0.9	1.2	1
M4419	1	1	0.9
M4965	0.9	1	0.9
M6068	1	1	1
M6455	0.9	0.9	1
M6863	0.9	0.9	1
M7181	1.1	0.9	1.1
M8559	0.9	1	0.8
PWS DEL	0.5	0.5	0.5

3.3.3 Analyse des *HBII-438A*-Locus

Das snoRNA-Gen *HBII-438A* wurde ebenfalls mit der Realtime-PCR auf Deletionen hin untersucht. Da *HBII-438A* und die gesamte benachbarte Region sequenzidentisch zum snoRNA-Gen *HBII-438B* sind, das etwa 240 bp telomerisch vom *HBII-52*-Gencluster liegt, (siehe Abb. 3.12), wurden die Primer und die Sonde zunächst 580 bp distal von *HBII-438A* gelegt, wo die Sequenzunterschiede größer sind.

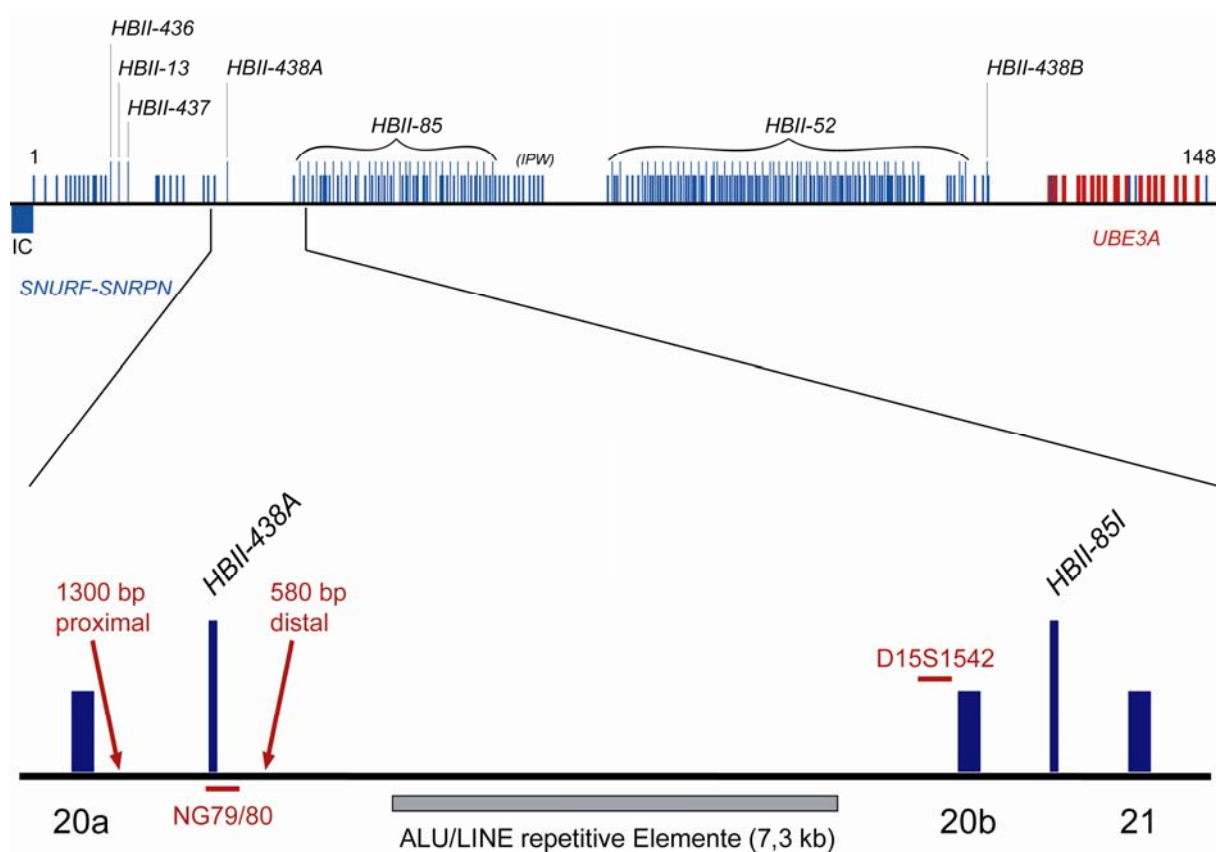


Abb. 3.12: Übersicht über die Lage der snoRNA-Gene *HBII-438A* und *HBII-438B* und der Sonden (NG79/80 und D15S1542). Die roten Pfeile zeigen die auf Deletionen untersuchten Bereiche.

In einem Patienten mit geringem Geburtsgewicht (M1682 in Tabelle 3.7) und zwei Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp (M4419 und M7181 in Tabelle 3.7) konnte hier eine Deletion nachgewiesen werden. Diese zeigten einen Wert von 0.5 wie die Deletionskontrolle (PWS DEL). Allerdings wurde diese Deletion später auch in einer anderen Normalperson (NP 1) gefunden, was auf einen Polymorphismus hinweist.

Anschließend wurde bei zwei der Patienten die Region 1300 bp proximal von *HBII-438A* untersucht (siehe Abb. 3.12), um zu überprüfen, ob die Deletion das snoRNA-Gen überspannt. Die Werte lagen an dieser Position jedoch im Bereich der Normalpersonen (siehe Tabelle 3.8). Hier konnte also keine Deletion nachgewiesen werden.

Tabelle 3.8: Realtime-PCR-Werte distal und proximal von *HBII-438A*.

Patient	Distal von <i>HBII-438A</i>	Proximal von <i>HBII-438A</i>
M1682	0.5	-
M4419	0.5	1
M7181	0.5	0.8
NP	1.1	0.9
NP 1	0.4	0.8
PWS DEL	0.5	0.5

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit mit *HBII-438B* und der stark repetitiven ALU/LINE-Elemente in der Umgebung war es nicht möglich neue spezifischere Primer und Sonden zu legen. Daher wurde mit der DNA der beiden Patienten eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die DNA mit dem Enzym *SacI* geschnitten, auf eine Membran geblottet und mit der Sonde NG79/80, welche eine Teilsequenz der *HBII-438*-Gene enthält und somit an beide snoRNA-Gene bindet, hybridisiert. Eine Deletion würde zu einer Reduktion in der Intensität der Hybridisierungssonde führen. Wie in der Normalperson war bei beiden Patienten die untere Bande mit der Größe von 8 kb, spezifisch für den *HBII-438A*-Locus stärker als die obere Bande mit der Größe von 10.5 kb, spezifisch für den *HBII-438B*-Locus (siehe Abb. 3.13). Bei der Deletionskontrolle mit einer IC-Deletion (IC DEL), die auch *HBII-438A* spannt, kommt es zu einer Abnahme der Intensität der Bande für *HBII-438A*. Somit konnte in beiden Patienten eine Deletion der *HBII-438A*-Kopie ausgeschlossen werden.

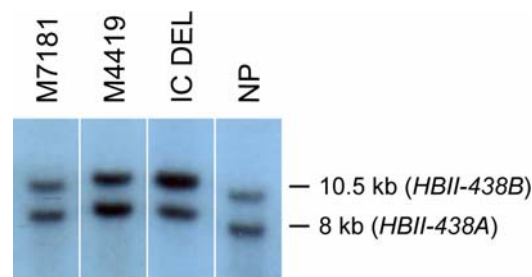


Abb. 3.13: Southern-Blot-Analyse der snoRNA-Gene *HBII-438A* und *HBII-438B*. Als Kontrollen wurden ein Patient mit einer IC-Deletion (IC DEL) und eine Normalperson (NP) mitgeführt.

Um das distale Ausmaß der Deletion zu bestimmen, wurde bei den drei Patienten (M1682, M4419 und M7181) und der Normalperson (NP 1) mit einer Deletion mittels Mikrosatelliten-Analyse mit dem Marker *D15S1542* die Region etwa 8 kb telomerisch von *HBII-438A* untersucht (siehe Abb. 3.12). Hier war keine Deletion nachzuweisen. Es fiel jedoch auf, dass diese Patienten und die Normalperson ein 333 bp großes Allel besaßen (siehe Abb. 3.14). Diese Allelgrößen kommen sehr selten vor. Bei PWS Imprinting Defekt-Patienten (PWS-ID) und ihren Eltern waren in der Routinediagnostik bislang Allelgrößen von hauptsächlich 342 bp bis 355 bp zu finden (nicht gezeigt).

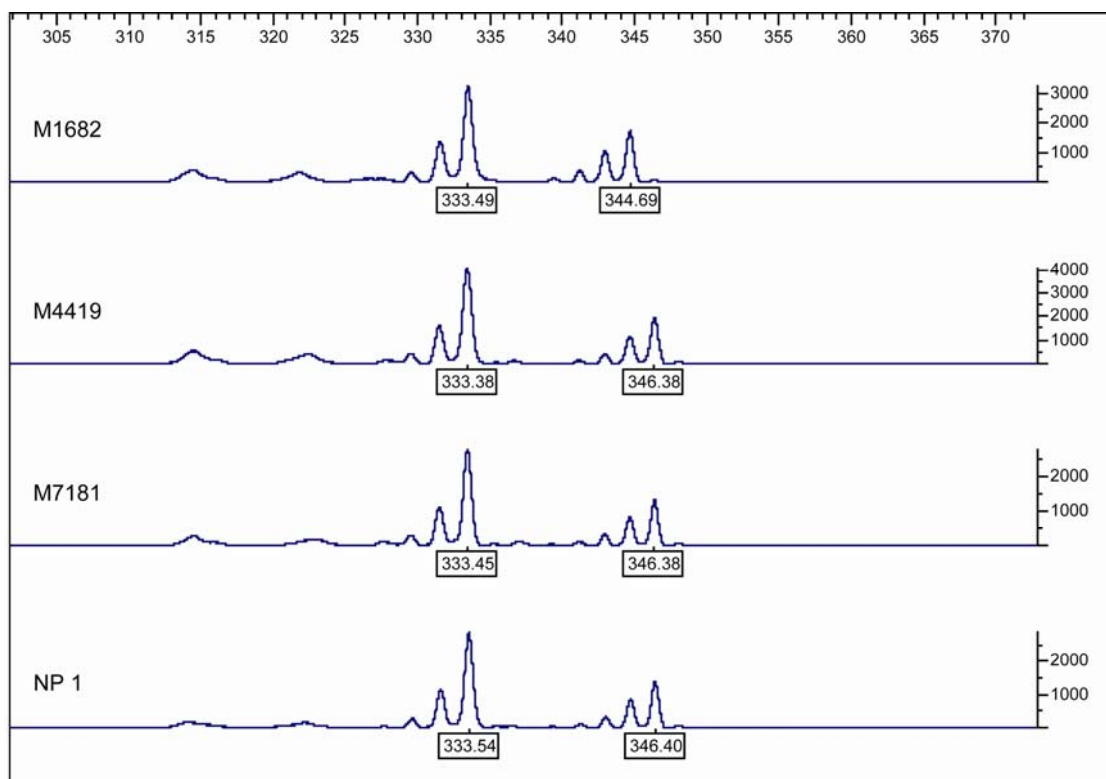


Abb. 3.14: Mikrosatellitenanalyse der Patienten und einer Normalperson (NP 1) mit einer Deletion 580 bp distal von *HBII-438A*. Die Allel-Größen sind unterhalb der Peaks angegeben.

Acht PWS-ID-Patienten (P) bzw. Vater (V) oder Mutter (M) einiger dieser Patienten (1-8 in Tabelle 3.8) und zwei Normalpersonen (NP 2.1 und NP 2.2 in Tabelle 3.8) mit einem Allel ≤ 342 bp wurden anschließend ebenfalls mittels Realtime-PCR analysiert. Sieben dieser Personen mit Allelgrößen von 331 bp, 333 bp und 335 bp zeigten in der Realtime-PCR Werte von 0.5-0.6 und damit dieselbe Deletion 580 bp distal von *HBII-438A* wie die oben beschriebenen Patienten. Das 333 bp große Allel kam in drei der untersuchten Patienten vor,

und die Allele mit 331 bp bzw. 335 bp Größe kamen jeweils in zwei Patienten vor. Es besteht demnach ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Deletions/Insertions-Polymorphismus und dem Locus 8 kb telomerisch von *HBII-438A*, wo der Marker *D15S1542* liegt. Eine Deletion 580 bp distal von *HBII-438A* kommt immer in Verbindung mit einer der seltenen Allele vor. Da die meisten Allel-Varianten mit höherer Frequenz aus der frühen Evolution des Menschen stammen (Freudenberg *et al.*, 2002), und eine Veränderung der Allelgrößen in beide Richtungen wahrscheinlicher ist als eine Veränderung in nur eine Richtung von 331 bp über 333 bp auf 335 bp bzw. von 335 bp über 333 bp auf 331 bp, kann man zusammenfassend sagen, dass die beiden Allele (331 bp und 335 bp) später in der Evolution entstanden sind als das 333 bp große Allel.

Tabelle 3.9: Allelgrößen und Realtime-PCR-Werte der PWS-ID-Familien und zweier Normalpersonen.

Patienten	Allelgröße	Realtime-PCR-Ergebnis
1 PWS-ID 1 (V)	333.29	0.5
2 PWS-ID 2.1 (M)	342.69	1.1
3 PWS-ID 2.2 (P)	342.69	0.8
4 PWS-ID 3.1 (P)	331.8	0.6
5 PWS-ID 3.2 (V)	331.8	0.6
6 PWS-ID 4 (M)	333.29	0.6
7 PWS-ID 5.1 (M)	340.92	1
8 PWS-ID 5.2 (V)	333.29	0.6
9 NP 2.1 (P)	335	0.5
10 NP 2.2 (V)	335	0.6

4. DISKUSSION

4.1 Imprinting-Defekte bei AS als Folge einer primären Epimutation

Das menschliche Genom beinhaltet schätzungsweise 100 bis 200 Gene, die dem genomischen Imprinting unterliegen. Fehler bei der Imprint-Umschaltung und der Aufrechterhaltung des Imprints können zu genetisch bedingten Erkrankungen oder zur Entstehung von Tumoren führen. Bei den meisten Patienten mit AS ist der Imprinting Defekt durch eine spontane primäre Epimutation ohne vorherige DNA-Sequenz-Veränderung entstanden (Buiting *et al.*, 2003). Bei diesen Patienten liegt die *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region auf dem maternalen Allel unmethyliert vor, und das *SNURF-SNRPN* Sense/*UBE3A* Antisense-Transkript kann exprimiert werden. Es wird vermutet, dass das *UBE3A*-Gen durch das Antisense-Transkript reguliert wird (Runte *et al.*, 2001a; Runte *et al.*, 2004; Landers *et al.*, 2004). Bei Patienten mit AS und einem Imprinting-Defekt (ASID) scheint dieses Antisense-Transkript, der Grund für die Stilllegung des *UBE3A*-Gens zu sein. Das Chromosom mit dem Imprinting-Defekt kann in diesen Patienten sowohl von der mütterlichen Großmutter als auch vom mütterlichen Großvater stammen. Daher muss der Defekt entweder bei der Imprint-Umschaltung kurz vor oder während der Fertilisation, oder bei der Aufrechterhaltung nach der Fertilisation entstanden sein (Buiting *et al.*, 2003).

4.1.1 Fehler bei der Imprint-Aufrechterhaltung führt zu einem somatischen Mosaik

Fehler in der Aufrechterhaltung des Imprints im Embryo führen zu einem somatischen Mosaik. In ASID-Patienten mit zellulärem Mosaik müssten demnach normale Zellen und Zellen mit einem Imprinting-Defekt zu finden sein. Für die Diagnostik wird die elternspezifische Methylierung in der *SNURF-SNRPN* Exon 1/Promotor-Region genutzt. ASID-Patienten mit einem somatischen Mosaik zeigen hier eine schwache methylierte maternale Bande. In zwei dieser Patienten konnten wir in der Tat ein zelluläres Mosaik nachweisen und nehmen an, dass alle Patienten mit einer zusätzlichen Bande somatische Mosaik sind. Es ist anzunehmen, dass auch ASID-Patienten, bei denen keine maternale Bande detektiert werden konnte, einen postzygoten Defekt in der Imprint-Aufrechterhaltung haben. Dafür gibt es zwei Erklärungen: 1. Die Menge an normalen Zellen ist so gering, dass sie mit unseren Methoden nicht mehr detektiert werden kann, dass aber ein höherer Anteil an normalen Zellen in anderen Geweben vorhanden ist, die uns nicht zur Verfügung stehen. 2. Der Imprinting-Defekt ist im Trophoblast entstanden, aus dem die Plazenta hervorgeht,

während der Embryo, aus der inneren Zellmasse entsteht, die nicht betroffen ist. In diesem Fall läge eine Mosaik-Situation nur in der Plazenta vor. Da wir keine Gewebeprobe aus der Plazenta dieser Patienten haben, ist es nicht möglich, dies zu untersuchen.

Bei 10-20% der AS-Patienten, die in der MS-PCR ein normales Methylierungsmuster zeigten, konnte keine Deletion, UPD, ID oder Mutation im *UBE3A*-Gen nachgewiesen werden. Ein somatisches Mosaik wäre auch hier eine mögliche Erklärung, wenn man annimmt, dass der Imprinting-Defekt nur in bestimmten Gehirnarealen vorhanden ist, wo *UBE3A* geprägt ist. Für unsere Untersuchungen stehen uns nur Blut und teilweise auch Fibroblasten zur Verfügung, jedoch lassen die Untersuchungsergebnisse in diesen beiden Geweben keine Rückschlüsse auf die Situation im Gehirnbereich zu.

4.1.2 Der Imprinting-Defekt ist kurz nach der Fertilisation entstanden

Ein Defekt bei der Aufrechterhaltung des Methylierungsimprints kann prinzipiell bei jeder Zellteilung stattfinden. Bei der Replizierung der DNA wird das Methylierungsimprint von der Methyltransferase Dnmt1 erkannt und auf den Tochterstrang kopiert. Die hemimethylierte DNA wird so vollständig methyliert und dadurch das Methylierungsimprint in den nachfolgenden Zellteilungen aufrechterhalten (Bestor, 2000; Reik und Walter, 2001). Ein Fehler bei der Erkennung oder Weitergabe des Methylierungsimprints würde zu zwei unterschiedlich methylierten Strängen führen, was in den folgenden Zellteilungen in zwei unterschiedlich geprägten Zelllinien resultieren würde. Es ist jedoch auch möglich, dass es während der genomweiten Demethylierung der DNA in den ersten Tagen der Entwicklung zu Fehlern bei der Aufrechterhaltung des Methylierungsimprints kommt.

Das paternale Genom wird wenige Stunden nach der Fertilisation aktiv demethyliert, während das maternale Genom in den nachfolgenden Zellteilungen passiv demethyliert wird. Anschließend folgt eine globale Remethylierung, die nach dem Blastozystenstadium endet (Reik und Walter, 2001). Die geprägten Regionen sind von der globalen De- und Remethylierung nicht betroffen. Allerdings ist nicht bekannt durch welche Mechanismen sie davor geschützt werden. Es ist denkbar, dass ein Fehler in diesem Schutzmechanismus zu einem Verlust des Imprints in einer Zelle führt. Da Imprints in somatischen Zellen nicht repariert werden können, würden die Tochterzellen diesen Imprinting-Defekt erben.

Um zu untersuchen, wann der Imprinting-Defekt in dieser kritischen Periode stattgefunden hat, haben wir in den Fibroblasten des Patienten ASID-71 eine X-Inaktivierungs-Untersuchung durchgeführt. Die X-Inaktivierung findet in der inneren Zellmasse

(Embryoblast) im Blastozystenstadium statt (Monk, 2002; Huynh und Lee, 2003; Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004) (siehe Abb. 4.1). Hat der Imprinting-Defekt vor der X-Inaktivierung stattgefunden, kommt es in den ID-Zellen, genau wie in den normalen Zellen, zu einer zufälligen Abschaltung eines der beiden X-Chromosomen, und im Embryo sind ID-Zellen zu finden, in denen das paternale X-Chromosom inaktiviert vorliegt und solche, in denen das maternale X-Chromosom inaktiviert vorliegt. Fand der Imprinting-Defekt jedoch in einer Zelle statt, in der ein X-Chromosom bereits inaktiviert wurde, so liegt in allen ID-Zellen dasselbe maternale bzw. paternale X-Chromosom inaktiviert vor.

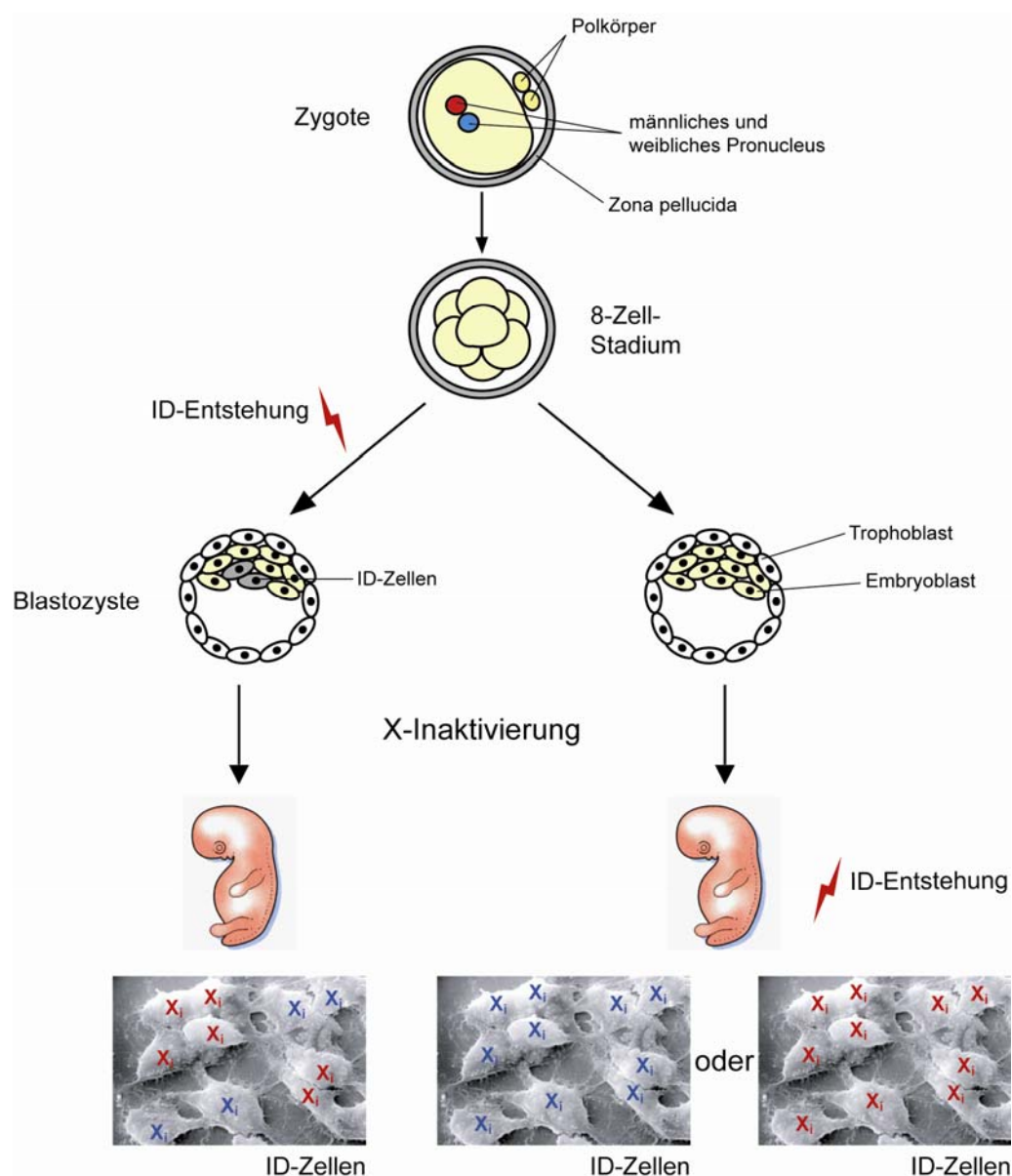


Abb. 4.1: Zeitpunkt der X-Inaktivierung und Entstehung des Imprinting-Defektes. Inaktivierte paternale X-Chromosomen sind blau (X_i) und inaktivierte maternale X-Chromosomen sind rot dargestellt (X_i).

In dem Patienten ASID-71 haben wir Zellen mit einem inaktivierten paternalen X-Chromosom und Zellen mit einem inaktivierten maternalen X-Chromosom gefunden. Demnach muss der Imprinting-Defekt also vor der X-Inaktivierung entstanden sein. Es wäre natürlich auch möglich, dass der Imprinting-Defekt nicht durch ein einmaliges Ereignis, sondern durch multiple unabhängige Ereignisse entstanden ist. Die Klone, die auf ihre Methylierung hin untersucht wurden, zeigten allerdings ein klares Methylierungs-Muster. Sie waren an allen CpGs entweder vollständig methyliert oder vollständig unmethyliert. Das deutet darauf hin, dass der Methylierungsimprint nicht instabil ist und der Imprinting-Defekt in diesem Patienten ein einmaliges Ereignis darstellt.

Es fällt auf, dass in den meisten Einzelzellklonen das paternale X-Chromosom inaktiviert vorlag. Diese Verschiebung der X-Inaktivierung zugunsten eines Allels wird „Skewing“ genannt und ist ein bekanntes frequent vorkommendes Phänomen. X-Inaktivierungsstudien zeigen, dass bei 28% der Frauen unter 25 Jahren ein solches Skewing zu finden ist (Sharp *et al.*, 2000). Daher denken wir, dass es nicht mit dem Imprinting-Defekt zusammenhängt.

Auch wenn wir den Zeitpunkt der Entstehung des Imprinting-Defekts nur bei einem Patienten näher bestimmen konnten, ist anzunehmen, dass er bei allen Patienten sehr früh in der Entwicklung stattgefunden hat.

4.1.3 Patienten mit einem höheren Grad an normal methylierten Zellen tendieren zu einem milderem Krankheitsverlauf

Mittels der Realtime-PCR-Methode konnten wir in 24 Patienten den Grad der normal methylierten Zellen genau ermitteln. Wir haben Werte von <1% bis 40% erhalten. Eine Regressionsanalyse zeigte, dass Patienten mit einem höheren Grad an normal methylierten Zellen zu einem milderem Krankheitsverlauf tendieren. Jedoch war der Zusammenhang statistisch nicht signifikant. Das kann daran liegen, dass die untersuchte Patienten-Gruppe zu klein war und Patienten mit einem ähnlichen Grad an normal methylierten Zellen teilweise unterschiedliche Phänotypen zeigten. Man muss jedoch beachten, dass wir die Analyse nur an DNA aus Blut-Zellen durchführen konnten und nicht wissen, wie die Verteilung von normal methylierten Zellen und Imprinting-Defekt-Zellen in anderen Geweben, insbesondere im Gehirn ist.

Obwohl alle hier untersuchten Patienten eine mentale Retardierung zeigen, scheinen die Symptome weniger ausgeprägt zu sein als bei Patienten mit typischem AS (siehe Tabelle 3.2). Am auffälligsten ist die Beobachtung, dass sieben von 18 Patienten mehr als zehn Worte sprechen können. Drei Patienten sprechen sogar einfache Sätze. Eine gute Auffassungsgabe, ist bei elf von 19 Patienten zu sehen. Die meisten können schon vor dem 21. Monat laufen. Viel früher als bei Lossie *et al.* (2001) beschrieben, die das mittlere Alter, bei dem die AS-Patienten mit einem Imprinting-Defekt mit dem Laufen beginnen, mit 28 Monaten angibt. Nur fünf von 19 Patienten haben Krämpfe. Mikrozephalie wurde nur in einem von 17 Patienten beobachtet. Ein ähnliches Ergebnis fanden auch zwei andere Arbeitsgruppen (Bürger *et al.*, 1997 und Saitoh *et al.*, 1997). Eine Ataxie, die zu den Hauptmerkmalen der Patienten mit AS zählt, zeigten nur acht von 19 Patienten, während Fettleibigkeit, häufiger (14 von 19 Patienten) zu beobachten war. Eine Entwicklungsverzögerung zusammen mit Fettleibigkeit, die aus der Hyperphagie resultiert, führt zu einer häufigen Fehldiagnose dieser Patienten, nämlich PWS.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Krankheit bei Patienten mit einem Imprinting-Defekt, weniger stark ausgeprägt zu sein scheint, als bei Patienten mit einer Deletion. Patienten mit einem Imprinting-Defekt im Mosaik zeigen tendenziell einen milderen Krankheitsverlauf bzw. einen für AS eher atypischen Phänotyp. Man sollte z.B. die klinische Diagnose AS nicht ausschließen, nur weil der Patient eine Sprachentwicklung aufweist. Wir vermuten, dass der ID in Fällen von mentaler Retardierung eine größere Rolle spielt als bisher angenommen. Um herauszufinden, ob ein Methylierungsmosaik vorliegt reicht die MS-PCR nicht aus. Man sollte einen quantitativen Test durchführen.

4.2 SnoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 als mögliche Kandidaten-Gene für Teilaspekte des PWS-Phänotyps

Zwei unabhängige Mausmodelle zeigten, dass eine paternale Deletion der Region zwischen *Snurf-Snrpn* Exon 1 und den *Ipw*-Exons (Tsai *et al.*, 1999a; Chamberlain *et al.*, 2004; Nicholls, 1999; Ding *et al.*, 2005) zu Mäusen mit einem PWS-ähnlichen Phänotyp führt. Diese Mäuse sind klein, hypoton und 80% der Nachkommen sterben schon kurz nach der Geburt. Balancierte Translokationen der paternalen Kopie von 15q11-q13 führen beim Menschen zu variablen PWS-ähnlichen Phänotypen mit variabler Ausprägung der einzelnen Symptome (Schüle *et al.*, 2005). Während Patienten mit einem Bruchpunkt im Exon 2 von *SNURF-SNRPN* PWS-typische Symptome zeigen, sind die mit einem Bruchpunkt im Exon 17 bzw. Exon 20 milder betroffen bzw. zeigen nur Teilsymptome von PWS. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine balancierte Translokation in einigen dieser Patienten zu einem Expressionsverlust von *HBII-85*-Genkopien führt (Wirth *et al.*, 2001, Schüle *et al.*, 2005, Gallagher *et al.*, 2002). Da die snoRNAs in dieser Region die einzigen konservierten Elemente zwischen Maus und Mensch sind, kommen die snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437* und *HBII-438A*, die als Einzelkopien vorliegen und das snoRNA-Gencluster *HBII-85* mit 27 Kopien als Kandidatengene für PWS-Symptome in Betracht. Aufgrund dieser Daten, wurde in vier verschiedenen Patienten-Gruppen mit verschiedenen Symptomen für PWS (Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp, konsekutive Patienten mit Verdacht auf PWS, mentaler Retardierung und Übergewicht, konsekutive Patienten mit Verdacht auf PWS, mentaler Retardierung, Übergewicht und geringem Geburtsgewicht und Patienten mit einer konstitutionellen Entwicklungsverzögerung (Kleinwuchs)) eine Untersuchung nach Deletionen der einzelnen snoRNA-Gene durchgeführt.

4.2.1 Bei Patienten mit Teilaspekten des PWS-Phänotyps liegt keine Deletion der snoRNA-Gene in der Region 15q11-q13 vor

Aufgrund der Daten von Translokationspatienten haben wir zunächst bei den Patienten mit einem PWS-ähnlichen Phänotyp und den Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht mittels der MAPH-Methode nach Deletionen im snoRNA-Gencluster *HBII-85* gesucht. Es konnte jedoch bei keinem dieser Patienten eine Deletion in dieser Region detektiert werden. Bei 14 dieser Patienten, konnte mit der vorhergehenden Southern Blot-Analyse auch keine strukturelle Veränderung gefunden werden. Da Mäuse mit einer paternalen Deletion in dieser Region verglichen mit den Geschwistertieren aus dem gleichen

Wurf extrem wachstumsretardiert sind und ein reduziertes Körpergewicht haben, wurden außerdem Patienten mit Kleinwuchs und Patienten mit einem geringen Geburtsgewicht mittels MAPH analysiert. Aber auch in diesem Patientenkollektiv konnte keine Dosisreduktion, die auf eine Deletion hinweist, nachgewiesen werden. Somit konnten wir die *HBII-85* snoRNA-Gene als Grund für mentale Retardierung in Verbindung mit Übergewicht, Kleinwuchs und geringem Geburtsgewicht bei den hier untersuchten Patienten ausschließen. Das Deletionsscreening der snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437* und *HBII-438A* wurde mit der Realtime-PCR-Methode nur in den Patienten mit geringem Geburtsgewicht und den Patienten mit PWS-ähnlichem Phänotyp, die zuvor mit der Southern Blot-Analyse untersucht wurden, durchgeführt. Keines der snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437* und *HBII-438A* war in den Patienten deletiert. Demnach kann man auch diese snoRNA-Gene als Grund für mentale Retardierung mit Übergewicht und das geringe Geburtsgewicht ausschließen.

Das *HBII-85* snoRNA-Gencluster besteht aus 27 Kopien. Runte *et al.* (2001a) konnten die snoRNA-Kopien aufgrund ihrer Sequenz in drei Gruppen unterteilen. Trotzdem ist die Sequenzhomologie der einzelnen Kopien sehr hoch, sodass wir nur an neun Positionen im snoRNA-Gencluster eine Sonde legen und damit nur ein Drittel abdecken konnten. Es könnte sein, dass nur einige snoRNA-Kopien aktiv sind bzw. alle aktiv sind, aber unterschiedliche Ziel-RNAs haben und wir die Kopien, die für die von uns untersuchten Symptome verantwortlich sind, nicht analysiert haben. Während für die snoRNA-Gene *HBII-13*, *HBII-85* und *HBII-436* Maushomologe identifiziert werden konnten (Cavaille *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2004), ist seit kurzem bekannt, dass für *HBII-437* und *HBII-438A* keine homologen snoRNA-Gene in der Maus vorhanden sind (Gallagher *et al.*, 2002; Schüle *et al.*, 2005). Somit überrascht es nicht, dass wir in unserer Patienten-Kohorte für *HBII-437* und *HBII-438A* keine Deletion gefunden haben. Jedoch zeigen Deletionsmäuse auch nicht das breite Spektrum der Symptome bei PWS wie sie beim Menschen bekannt ist. Z.B. werden Mäuse mit PWS nicht adipös. Vielleicht spiegelt die Maus nicht die menschliche Situation wider und diese beiden snoRNA-Gene spielen beim Menschen für die Ausprägung von Teilaspekten von PWS doch eine Rolle.

Zusammengefasst würde das bedeuten, dass entweder die Auswahlkriterien für die Patienten nicht richtig bzw. ausreichend waren oder die Fallzahl zu niedrig war. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass die snoRNA-Gene keine Kandidatengene für PWS-Symptome sind. Weiterhin sind die Zielgene der snoRNAs bisher nicht bekannt und es liegen keine Informationen über ihre Funktion vor, die hilfreich wären.

4.2.2 Eine Deletion 580 bp distal von *HBII-438A* steht im Kopplungsungleichgewicht mit einem Locus 8 kb telomerisch von *HBII-438A*

Auf der Suche nach einer Deletion des snoRNA-Gens *HBII-438A* sind wir 580 bp distal des Gens auf einen Deletions/Insertions-Polymorphismus gestoßen. Bei dem Versuch, die Deletion näher einzugrenzen haben wir festgestellt, dass diese immer in Verbindung mit einem seltenen Allelen vorkommt. Es besteht demnach ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Deletions/Insertions-Polymorphismus und dem Locus 8 kb telomerisch von *HBII-438A*, wo der Marker *D15S1542* liegt. Ein Kopplungsungleichgewicht ist die nicht-zufällige Assoziation von Allelen gekoppelter Genloci (www.thieme.de/viamedici/lernen/glossar/k.html). Die Existenz eines Kopplungsungleichgewichtes bedeutet, dass man aus dem Wissen über das Vorliegen der ersten Variante eines Allels mit einer erheblichen Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen der zweiten Variante schließen kann. Diesen Zusammenhang kann man zur Suche nach Krankheitsgenen ausnutzen (Freudenberg *et al.*, 2002). In unserem Fall, scheint der Polymorphismus eine neutrale Variante zu sein, da er auch in Normalpersonen mit dem seltenen Allel zu finden war.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom entstehen durch den Funktionsverlust von elternspezifisch exprimierten Genen in der chromosomalen Region 15q11-q13, die der koordinierten Kontrolle des Imprinting-Centers unterliegen. Während der Verlust der Expression paternal exprimierter Gene zu PWS führt, resultiert ein Funktions-Verlust des *UBE3A*-Gens in AS. Eine eher seltene Ursache für die Inaktivierung von Genen in dieser Region sind Imprinting-Defekte (ID). Die Patienten mit einem ID haben zwar zwei Chromosomen 15 biparentaler Herkunft, jedoch haben beide denselben Epigenotyp. Bei Patienten mit AS tragen beide Chromosomen 15 ein paternales Imprint und bei PWS-Patienten beide Chromosomen 15 ein maternales Imprint.

Einige AS-Patienten mit einem ID zeigten in der methylierungsspezifischen PCR ein auffälliges Methylierungsmuster, das ein somatisches Mosaik vermuten ließ. Mit zwei unterschiedlichen Klonierungsmethoden konnte dies in zwei Patienten auch nachgewiesen werden. Bei einem von beiden konnte außerdem gezeigt werden, dass der Imprinting-Defekt kurz nach der Fertilisation entstanden sein muss. In den restlichen Patienten konnte der Grad der normal methylierten Zellen genau quantifiziert werden. Es wurden Werte von <1% bis 40% ermittelt. Für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation wurden klinische Daten gesammelt. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem höheren Grad an normal methylierten Zellen zu einem mildereren Krankheitsverlauf tendieren. Jedoch war der Zusammenhang statistisch nicht signifikant. Für einen PWS-Patienten mit einem somatischen Mosaik wurden 54% normal methylierte Zellen ermittelt.

Anhand verschiedener Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass snoRNA-Gene (*HBII-13*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A*, *HBII-85*) in der Region 15q11-q13 als Kandidaten-Gene für PWS in Betracht kommen könnten. Daher wurden Patienten mit Teilsymptomen für PWS, wie z.B. Patienten mit mentaler Retardierung und Übergewicht, Kleinwuchs oder mit geringem Geburtsgewicht auf Deletionen dieser snoRNA-Gene hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass keine dieser snoRNA-Gene als Grund für die beschriebenen Symptome in Betracht kommt. Auch für einen Deletions-Polymorphismus, der distal von *HBII-438A* entdeckt wurde und mit einem seltenen Allel in dieser Region im Kopplungsungleichgewicht steht, konnte gezeigt werden, dass es sich hier um eine neutrale Variante handelt und somit nicht kausal mit der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden kann.

6. LITERATUR

- Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanaach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaudet AL (1997) Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, *Ube3a*, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**: 75-78.
- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* **65**: 370-386.
- Angelman H (1965) Puppet children: A report of three cases. *Dev Med Neurol* **7**: 681-688.
- Angulo M, Castro-Mangana M, Uy J, Rosenfeld W (1992) Growth hormone evaluation and treatment in Prader-Willi syndrome. NATO ASI Series (Ed. by SB Cassidy) Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, *Cell Biol* **61**: 171-174.
- Antonarakis SE, Blouin JL, Maher J, Avramopoulos D, Thomas G, Talbot CC Jr (1993) Maternal uniparental disomy for human chromosome 14, due to loss of a chromosome 14 from somatic cells with t(13;14) trisomy 14. *Am J Hum Genet* **52**: 1145-1152.
- Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA (2001) A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* **10**: 1475-1483.
- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* **28**: 605-609.
- Bachelier JP und Cavaillé J (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *Trends Biochem Sci* **22**: 257-261.
- Barton SC, Surani MAH, Norris ML (1984) Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature* **311**: 374-376.
- Baumer A, Wiedemann U, Hergersberg M, Schinzel A (2001) A novel MSP/DHPLC method for the investigation of the methylation status of imprinted genes enables the molecular detection of low cell mosaicisms. *Hum Mutat* **17**: 423-430.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G (1999) The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell* **98**: 387-396.
- Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**: 2395-2402.
- Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B, Brannan CI (2000) *De novo* deletions of *SNRPN* exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nat Genet* **25**: 74-78.
- Birnboim HC und Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Boccaccio I, Glatt-Deeley H, Watrin F, Roeckel N, Lalande M, Muscatelli F (1999) The human *MAGEL2* gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. *Hum Mol Genet* **8**: 2497-2505.
- Bourhis D, Xu GL, Lin Cs, Bollman B, Bestor TH (1999) Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* **294**: 2536-2539.
- Brownstein BH, Silverman GA, Little RD, Burke DT, Korsmeyer SJ, Schlessinger D, Olson MV (1989) Isolation of single-copy human genes from a library of yeast artificial chromosome clones. *Science* **244**: 1348-1351.

- Buiting K, Greger V, Brownstein BH, Mohr RM, Voiculescu I, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1992) A putative gene family in 15q11-13 and 16p11.2: Possible implications for Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 5457-5461.
- Buiting K, Saitoh S, Groß S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* **9**: 395-400.
- Buiting K, Dittrich B, Ende S, Horsthemke B (1996) Identification of novel 3' exons of the human *SNRPN* gene. *Genomics* **40**: 132-137.
- Buiting K, Groß S, Ji Y, Senger G, Nicholls RD, Horsthemke B (1998a) Expressed copies of the *MN7 (D15S37)* gene family map close to the common deletion breakpoints in the Prader-Willi/Angelman syndromes. *Cytogenet Cell Genet* **81**: 247-253.
- Buiting K, Dittrich B, Groß S, Lich C, Färber C, Buchholz T, Smith E, Reis A, Bürger J, Nöthen MM, Barth-Witte U, Janssen B, Abeliovich D, Lerer I, van den Ouweland AMW, Halley DJJ, Schrander-Stumpel C, Smeets H, Meinecke P, Malcolm S, Gardner A, Lalonde M, Nicholls RD, Friend K, Schulze A, Matthijs G, Kokkonen H, Hilbert P, van Maldergem L, Glover G, Carbonell P, Willems P, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B (1998b) Sporadic imprinting defects in Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: Implications for imprint switch models, genetic counseling and prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* **63**: 170-180.
- Buiting K, Färber C, Kroisel P, Wagner K, Brueton L, Robertson ME, Lich C, Horsthemke B (2000) Imprinting centre deletions in two PWS families: implications for diagnostic testing and genetic counseling. *Clin Genet* **58**: 284-290.
- Buiting K, Groß S, Lich C, Gillessen-Kaesbach G, El-Maari O, Horsthemke B (2003) Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndrome: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* **72**: 571-577.
- Bürger J, Buiting K, Dittrich B, Groß S, Lich C, Sperling K, Horsthemke B, Reis A (1997) Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **61**: 88-93.
- Butler MG und Palmer CG (1983) Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* **1**: 1285-1286.
- Butler MG, Meaney FJ, Palmer CG (1986) Clinical and cytogenetic survey of 39 individuals with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Am J Med Genet* **23**: 793-809.
- Butler MG (1990) Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. *Am J Med Genet* **35**: 319-332.
- Carrel L und Willard HF (1996) An assay for X inactivation based on differential methylation at the fragile X locus, FMR1. *Am J Med Genet* **64**: 27-30.
- Cattanach BM und Kirk M (1985) Differential activity of maternally and paternally derived chromosome regions in mice. *Nature* **315**: 496-498.
- Cattanach BM, Barr JA, Evans EP, Burtenshaw M, Beechey V, Leff SE, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Jones J (1992) A candidate mouse model for Prader-Willi syndrome which shows an absence of *SNRPN* expression. *Nat Genet* **2**: 270-274.
- Cattanach BM, Barr JA, Beechey CV, Martin J, Noebels J, Jones J (1997) A candidate model for Angelman syndrome in the mouse. *Mamm Genome* **8**: 472-478. Erratum **8**: 877.

- Cavaillé J und Bachellerie J-P (1996) Processing of fibrillarin associated snoRNAs from pre-mRNA introns: an exonucleolytic process exclusively directed by the common stem-box terminal structure. *Biochemie* **78**: 443-456.
- Cavaillé J, Buiting K, Kieffmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Hüttenhofer A (2000) Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 14311-14316.
- Cedar H (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell* **53**: 3-4.
- Chaddha V, Agarwal S, Phadke SR, Halder A (2003) Low level of mosaicism in atypical Prader Willi syndrome: detection using fluorescent in situ hybridization. *Indian Pediatr* **2**: 166-168.
- Chai J-H, Locke DP, Greally JM, Knoll JHM, Ohta T, Dunai J, Yavor A, Eichler EE, Nicholls RD (2003) Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons. *Am J Hum Genet* **73**: 898-925.
- Chaillet RJ, Knoll JHM, Horsthemke B, Lalande M (1991) The syntenic relationship between the critical deletion region for the Prader-Willi/Angelman syndromes and proximal mouse chromosome 7. *Genomics* **11**: 773-776.
- Chamberlain SJ und Brannan CI (2001) The Prader-Willi syndrome imprinting-center activates the paternally expressed murine *Ube3a* antisense transcript, but represses paternal *Ube3a*. *Genomics* **73**: 316-322.
- Chamberlain SJ, Johnstone KA, DuBose AJ, Simon TA, Bartolomei MS, Resnick JL, Brannan CI (2004) Evidence for genetic modifiers of postnatal lethality in PWS-IC deletion mice. *Hum Mol Genet* **13**: 2971-2977.
- Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S (2001) An overview of the *MAGE* gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**: 5544-5551.
- Christian SL, Robinson WP, Huang B, Mutirangura A, Line MR, Nakao M, Surti U, Chakravarti A, Ledbetter DH (1995) Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* **57**: 40-48.
- Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH (1999) Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* **8**: 1025-1037.
- Clark JM (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res* **16**: 9877-9886.
- Conroy JM, Grebe TA, Becker LA, Tsuchiya K, Nicholls RD, Buiting K, Horsthemke B, Cassidy SB, Schwartz S (1997) Balanced translocation 46,XY,t(2;15)(q37.2;q11.2) associated with atypical Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **61**: 388-394.
- Cotter PD, Kaffé S, McCurdy LD, Jhaveri M, Willner JP, Hirschhorn K (1997) Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* **70**: 74-79.

- DeLorey TM, Handforth A, Anagnostaras SG, Homanics GE, Minassian BA, Asatourian A, Fanselow MS, Delgado-Escueta A, Ellison GD, Olsen RW (1998) Mice lacking the beta3 subunit of the GABAA receptor have the epilepsy phenotype and many of the behavioral characteristics of Angelman syndrome. *J Neurosci* **18**: 8505-8514.
- Dhar M, Webb LS, Smith L, Hauser L, Johnson D, West DB (2000) A novel ATPase on mouse chromosome 7 is a candidate for increased body fat. *Physiol Genomics* **4**: 93-100.
- Ding F, Prints Y, Dhar MS, Johnson DK, Garnacho-Montero C, Nicholls RD, Francke U (2005) Lack of Pwcr1/MBII-85 snoRNA is critical for neonatal lethality in Prader-Willi syndrome mouse models. *Mamm Genome* **16**: 424-431.
- Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, Saitoh S, Nicholls RD, Poustka A, Winterpacht A, Zabel B, Horsthemke B (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the *SNRPN* gene. *Nat Genet* **14**: 163-170.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* **28**: e32.
- Eiholzer U, I'Allemand D, van der Sluis I, Steinert H, Gasser T, Ellis K (2000) Body composition abnormalities in children with Prader-Willi syndrome and long term effects of growth hormone therapy. *Horm Res* **53**: 200-206.
- El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K, Urman B, Heyd J, Lich C, Brannan CI, Walter J, Horsthemke B (2001) Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat Genet* **27**: 341-344.
- Engel E (1993) Uniparental disomy revisited: the first twelve years. *Am J Med Genet* **46**: 670-674.
- Färber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B (1999) The chromosome 15 imprinting centre (IC) has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of *SNRPN* that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC deletion. *Hum Mol Genet* **2**: 337-343.
- Färber C, Groß S, Neesen J, Buiting K, Horsthemke B (2000) Identification of a testis-specific gene (*C15ORF2*) in the Prader-Willi syndrome region on chromosome 15. *Genomics* **65**: 174-183.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1984) Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **137**: 266-267.
- Fragapane P, Prislei S, Michienzi A, Caffarelli E, Bozzoni I (1993) A novel small nucleolar RNA (U16) is encoded inside a ribosomal protein intron and originates by processing of the pre-mRNA. *EMBO J* **12**: 2921-2928.
- Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P (2002) Blockstruktur des menschlichen Genoms. *Dtsch Arztebl* **99**: A3190-3195.

- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**: 1047-1058.
- Fulmer-Smentek S und Francke U (2001) Association of acetylated histones with paternally expressed genes in the Prader-Willi deletion region. *Hum Mol Genet* **10**: 645-652.
- Gabriel J, Merchant M, Ohta T, Ji Y, Caldwell RG, Ramsey MJ, Tucker JD, Longnecker R, Nicholls RD (1999) A transgene insertion creating a heritable chromosome deletion mouse model of Prader-Willi and Angelman syndromes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 9258-9263.
- Gallagher RC, Pils B, Albalwi M, Francke U (2002) Evidence for the role of PWCR1/HBII-85 C/D box small nucleolar RNAs in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **3**: 669-678.
- Ganot P, Bortolin ML, Kiss T (1997) Site-specific pseudouridine formation in peribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**: 799-809.
- Gardiner-Garden M und Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* **196**: 261-282.
- Gerard M, Hernandez L, Wevrick R, Stewart CL (1999) Disruption of the mouse *Necdin* gene results in early post-natal lethality. *Nat Gene* **23**: 199-202.
- Gillessen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B (1999) A previously unrecognized phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* **7**: 638-644.
- Glenn CC, Nicholls RD, Robinson WP, Saitoh S, Niikawa N, Schinzel A, Horsthemke B, Driscoll DJ (1993) Modification of 15q11-q13 DNA methylation imprints in unique Angelman and Prader-Willi patients. *Hum Mol Genet* **2**: 1377-1382.
- Gray TA, Saitoh S, Nicholls RD (1999a) An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 5616-5621.
- Gray TA, Smithwick MJ, Schaldach MA, Martone DL, Graves JA, McCarrey JR, Nicholls RD (1999b) Concerted regulation and molecular evolution of the duplicated *SNRPN* and *SNRPN* loci. *Nucleic Acids Res* **27**: 4577-4585.
- Hall JG (1990) Genomic imprinting: Review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* **46**: 857-873.
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM (2000) CTCF mediates methylation-sensitive enhancer blocking activity at the *H19/Igf2* locus. *Nature* **405**: 486-489.
- Hata K, Okano M, Lei H, Li E (2002) Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**: 1983-1993.
- Hayashi Y, Matsuyama K, Tagaki K, Sugiura H, Yoshikawa K (1995) Arrest of cell growth by *necdin*, a nuclear protein expressed in postmitotic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* **213**: 317-324.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996) Real-time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986-994.

- Henry I, Bonaiti-Pellie C, Chehensse V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G, Junien C (1991) Uniparental disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* **351**: 665-667.
- Herzing LB, Kim SJ, Cook EH, Ledbetter DH (2001) The human aminophospholipid-transporting ATPase gene *ATP10C* maps adjacent to *UBE3A* and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* **68**: 1501-1505.
- Herzing LB, Cook EH Jr, Ledbetter DH (2002) Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression of *UBE3A* and imprint maintenance within 15q11- q13 duplications. *Hum Mol Genet* **11**: 1707-1718.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction products by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7276-7280.
- Horsthemke B (1998) Genomisches Imprinting beim Menschen: Grundlagen und klinische Relevanz. *Biospektrum* **4**: 23-26.
- Horsthemke B, Nazlican H, Husing J, Klein-Hitpass L, Claussen U, Michel S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, Buiting K (2003) Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum Mol Genet* **12**: 2723-2732.
- Huynh KD und Lee JT (2003) Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* **426**: 857-862.
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556-560.
- Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei M-G, Malzac P, Roëckel N, Taviaux S, Lefranc J-L, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F (1997) The human necdin gene, *NDN*, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* **17**: 357-361.
- Ji Y, Walkowicz M, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD (1999) The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in the Prader-Willi/Angelman region encodes a large protein implicated in protein trafficking that is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **8**: 533-542.
- Jiang YH, Armstrong D, Albrecht U, Atkins CM, Noebels JL, Eichele G, Sweatt JD, Beaudet AL (1998) Mutation of the Angelman ubiquitin ligase in mice causes increased cytoplasmic p53 and deficits of contextual learning and long-term potentiation. *Neuron* **21**: 799-811.
- Jiang Y, Lev-Lehman E, Bressler J, Tsai TF, Beaudet AL (1999) Genetics of Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **65**: 1-6.
- Jong MTC, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD (1999a) A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet* **8**: 783-793.
- Jong MTC, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM, Nicholls RD (1999b) Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. *Hum Mol Genet* **8**: 795-803.

- Kamel A, Margery V, Norstedt G, Thoren M, Lindgren AC, Bronnegard M, Marcus C (1995) Growth hormone (GH) treatment up-regulates GH receptor mRNA levels in adipocytes from patients with GH deficiency and Prader-Willi syndrome. *Ped Res* **38**: 418-421.
- Kaplan LC, Wharton R, Elias E, Mandell F, Donlon TA, Latt SA (1987) Clinical heterogeneity associated with deletions in the long arm of chromosome 15: Report of three new cases and their possible significance. *Am J Med Genet* **28**: 45-53.
- Kass SU, Landsberger N, Wolffe AP (1997) DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol* **7**: 157-165.
- Kishino T, Lalande M, Wagstaff J (1997) *UBE3A/E6-AP* mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 70-73.
- Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**: 1077-1088.
- Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, Nicholls RD, Cedar H (1993) Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature* **364**: 459-463.
- Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM Jr, Lalande M, Latt SA (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* **32**: 285-290.
- Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Glatt K, Graham JM Jr, Kaplan L, Lalande M (1990) Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* **47**: 149-155.
- Knoll JH, Glatt KA, Nicholls RD, Malcolm S, Lalande M (1991) Chromosome 15 uniparental disomy is not frequent in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* **48**: 16-21.
- Knoll JHM, Cheng SD, Lalande M (1994) Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nat Genet* **6**: 41-45.
- Kurosawa K, Sasaki H, Sato Y, Yamanaka M, Shimizu M, Ito Y, Okuyama T, Matsuo M, Imaizumi K, Kuroki Y, Nishimura G (2002) Paternal UPD14 is responsible for a distinctive malformation complex. *Am J Med Genet* **110**: 268-272.
- Kuslich CD, Kobori JA, Mohapatra G, Gregorio-King C, Donlon TA (1999) Prader-Willi Syndrome Is Caused by Disruption of the SNRPN Gene. *Am J Hum Genet* **64**: 70-76.
- Landers M, Bancescu DL, Le Meur E, Rougeulle C, Glatt-Deeley H, Brannan C, Muscatelli F, Lalande M (2004) Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* **32**: 3480-3492.
- Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan SB, Crawford JD (1981) Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **304**: 325-329.
- Ledbetter DH, Mascarello JT, Riccardi VM, Harper VD, Airhart SD, Strobel RJ (1982) Chromosome 15 abnormalities and the Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **34**: 278-285.
- Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F (2002) Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development* **8**: 1807-1817.
- Lee PDK, Brannan CI, Hintz RL, Rosenfeld RG (1987) Growth hormone treatment of short stature in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol* **2**: 31-34.

- Lee S, Kozlov S, Hernandez L, Chamberlain SJ, Brannan CI, Stewart CL, Wevrick R (2000) Expression and imprinting of *MAGEL2* suggest a role in Prader-Willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. *Hum Mol Genet* **9**: 1813-1819.
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA-Methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365.
- Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR products and nucleic acid hybridisation. *PCR Methods Appl* **4**: 357-362.
- Lossie AC, Whitney MM, Amidon D, Dong HJ, Chen P, Theriaque D, Hutson A, Nicholls RD, Zori RT, Williams CA (2001) Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* **38**: 834-845.
- MacDonald H und Wevrick R (1997) The *neddin* gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse. *Hum Mol Genet* **11**: 1873-1878.
- Magenis RE, Brown MG, Lacy DA, Budden S, Fafranchi S (1987) Is Angelman syndrome an alternate result of del(15)(q11-13)? *Am J Med Genet* **28**: 829-838.
- Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, Robb S, Webb T, Armour JAL, Jeffreys AJ, Pembrey ME (1991) Uniparental disomy in Angelman's syndrome. *Lancet* **337**: 694-697.
- Mak W, Nesterova TB, de Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N (2004) Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* **303**: 666-669.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Nicholls RD (1992) The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **326**: 1599-1607.
- Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P, Galjaard RJ, Jiang YH, Benton CS, Rommens JM, Beaudet AL (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (*UBE3A*) in Angelman syndrome. *Nat Genet* **15**: 74-77.
- Maxwell ES und Fournier MJ (1995) The small nucleolar RNAs. *Annu Rev Biochem* **35**: 897-934.
- Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K, Nakao M, Kondo I, Saitoh S, Oshimura M (2001a) A novel maternally expressed gene, *ATP10C* encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* **28**: 19-20.
- Mertineit C, Yoder JA, Taketo T, Laird DW, Trasler JM, Bestor TH (1998) Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* **5**: 889-897.
- Monk, M (2002) Mammalian embryonic development--insights from studies on the X chromosome. *Cytogenet Genome Res* **99**: 200-209.
- Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS (2002) Mice lacking paternally expressed *Pref-1/Dlk1* display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol* **22**: 5585-5592.

- Mowery-Rushton PA, Hanchett JM, Zipf WB, Rogan PK, Surti U (1996) Identification of mosaicism in Prader-Willi syndrome using fluorescent in situ hybridization. *Am J Hum Genet* **4**: 403-412.
- Muscattelli F, Abrous DN, Massacrier A, Boccaccio I, Le Moal M, Cau P, Cremer H (2000) Disruption of the mouse *Necdin* gene results in hypothalamic and behavioral alteration reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**: 3101-3110.
- Nazlican H, Zeschneigk M, Claussen U, Michel S, Boehringer S, Gillesen-Kaesbach G, Buiting K, Horsthemke B (2004) Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* **13**: 2547-2555.
- Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M (1989) Genetic imprinting suggested by maternal uniparental heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. *Nature* **342**: 281-285.
- Nicholls RD (1993) Genomic imprinting and candidate genes in the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Curr Opin Genet Dev* **3**:445-456.
- Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* **14**: 194-200.
- Nicholls RD (1999) Incriminating gene suspects, Prader-Willi style. *Nat Genet* **23**: 132-124.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenko V (2001) CTCF is a uniquely versatile transcription blocking activity of vertebrate insulators. *Trends Genet* **17**: 520-527.
- Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B, Nicholls RD (1999a) Molecular mechanism of Angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *Am J Hum Genet* **64**: 385-396.
- Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD (1999b) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* **64**: 397-413.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* **303**: 644-649.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li e (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a und Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257.
- Olek A, Oswald J, Walter J (1996) A modified and improved method for bisulfite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res* **24**: 5064-5066.
- Özcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (*SNRPN*), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nature Genet* **2**: 265-269.
- Paoloni-Giacobino A und Chaillet JR (2004) Genomic imprinting and assisted reproduction. *Reprod Health* **1**: 6.
- Pedone PV, Pikaart MJ, Cerrato F, Vernucci M, Ungaro P, Bruni CB, Riccio A (1999) Role of histone acetylation and DNA methylation in the maintenance of the imprinted expression of the H19 and Igf2 genes. *FEBS Lett* **458**: 45-50.
- Pelczar P und Filipowicz W (1998) The host gene for intronic U17 small nucleolar RNAs in mammals has no protein-coding potential and is a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family. *Mol Cell Biol* **18**: 4509-4518.

- Pembrey M, Fennell SJ, van den Berghe J, Fitchett M, Summers D, Butler L, Clarke C, Griffiths M, Thompson E, Super M (1988) The association of Angelman's syndrome with deletions within 15q11-13. *J Med Genet* **26**: 73-77.
- Prader A, Labhart A, Willi H (1956) Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. *Schweiz Med Wochenschr* **86**: 1260-1261.
- Razin A und Cedar H (1994) DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* **77**: 473-476.
- Reik W, Collick A, Norris ML, Barton S, Surani A (1987) Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature* **328**: 248-251.
- Reik W (1989) Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet* **5**: 331-336.
- Reik W und Maher E R (1997) Imprinting in clusters: lessons from Beckwith–Wiedemann syndrome. *Trends Genet* **13**: 330–334.
- Reik W und Surani MA (Eds) (1997) Genomic Imprinting. Oxford: Oxford University Press.
- Reik W und Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* **2**: 21-32.
- Reis A, Dittrich B, Greger V, Buiting K, Lalande M, Gillessen-Kaesbach G, Anvret M, Horsthemke B (1994) Imprinting mutations suggested by abnormal DNA methylation patterns in familial Angelman and Prader-Willi syndromes. *Am J Hum Genet* **54**: 741-747.
- Robinson WP (2000) Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. *Bioessays* **22**: 452-459.
- Rougeulle C, Glatt H, Lalande M (1997) The Angelman syndrome candidate gene, *UBE3A/E6-AP*, is imprinted in brain. *Nature Genet* **17**: 14-15.
- Rougeulle C, Cardoso C, Fontés M, Colleaux L, Lalande M (1998) An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nature Genet* **19**: 15-16.
- Runte M, Hüttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K (2001a) The IC-*SNURF-SNRPN* transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for *UBE3A*. *Hum Mol Genet* **10** (23): 2687-2700.
- Runte M, Färber C, Lich C, Zeschnigk M, Buchholz T, Smith A, Van Maldergem L, Bürger J, Muscatelli F, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B, Buiting K (2001b) Comprehensive methylation analysis in typical and atypical PWS and AS patients with normal biparental chromosomes 15. *Eur J Hum Genet* **9**: 519-526.
- Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K (2004) SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* **114**: 553-561.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Saitoh S, Harada N, Jinno Y, Hashimoto K, Imaizumi K, Kuroki Y, Fukushima Y, Sugimoto T, Renedo M, Wagstaff J, et al (1994) Molecular and clinical study of 61 Angelman syndrome patients. *Am J Med Genet* **52**: 158-163.

- Saitoh S, Buiting K, Rogan PK, Buxton JL, Driscoll DJ, Arnemann J, König R, Malcom S, Horsthemke B, Nicholls RD (1996) Minimal definition of the imprinting center and fixation of a chromosome 15q11-q13 epigenotype by imprinting mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 7811-7815.
- Saitoh S, Buiting K, Cassidy SB, Conroy JM, Driscoll DJ, Gabriel J, Gillissen-Kaesbach G, Glenn CC, Greenswag LR, Horsthemke B, Kondo I, Kuwajima K, Niikawa N, Rogan PK, Schwartz S, Seip J, Williams CA, Nicholls RD (1997) Clinical spectrum and molecular diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome patients with an imprinting mutation. *Am J Med Genet* **68**: 195-206.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* **373**: 81-83.
- Schuffenhauer S, Buchholz T, Stengel-Rutkowski S, Buiting K, Schmidt H, Meitinger T (1996) A familial deletion in the Prader-Willi syndrome region including the imprinting control region. *Human Mutation* **8**: 288-292.
- Schule B, Albalwi M, Northrop E, Francis DI, Rowell M, Slater HR, Gardner RJ, Francke U (2005) Molecular breakpoint cloning and gene expression studies of a novel translocation t(4;15)(q27;q11.2) associated with Prader-Willi syndrome. *BMC Med Genet* **6**: 18.
- Schulze A, Hansen C, Skakkebaek NE, Brondum-Nielsen K, Ledbeter DH, Tommerup N (1996) Exclusion of SNRPN as a major determinant of Prader-Willi syndrome by a translocation breakpoint. *Nat Genet* **12**: 452-454.
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P (2000) Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* **107**: 343-349.
- Simon I, Tenzen T, Reubinoff BE, Hillman D, McCarrey JR, Cedar H (1999) Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* **401**: 929-932.
- Slatter RE, Elliott M, Welham K, Carrera M, Schofield PN, Barton DE, Maher ER (1994) Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* **31**: 749-753.
- Smith CM und Steitz JA (1998) Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol* **18**: 6897-6909.
- Smith J, Carpten M, Brownstein S, Gosh V, Magnuson D, Gilbert J, Trent J, Collins F (1995) An approach to genotyping errors caused by non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Res* **5**: 312-317.
- Solter D (1987) Inertia of the embryonic genome in mammals. *Trends Genet* **3**: 23-27.
- Solter D (1988) Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Ann Rev Genet* **22**: 127-146.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.
- Spritz RA, Bailin T, Nicholls RD, Lee ST, Park SK, Mascari MJ, Butler MG (1997) Hypopigmentation in the Prader-Willi syndrome correlates with P gene deletion but not with haplotype of the hemizygous P allele. *Am J Med Genet* **71**: 57-62.

- Strahl BD und Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41-45.
- Sun Y, Nicholls RD, Butler MG, Saitoh S, Hainline BE, Palmer CG (1996) Breakage in the SNRPN locus in a balanced 46,XY,t(15;19) Prader-Willi syndrome patient. *Hum Mol Genet* **5**: 517-524.
- Surani MAH, Barton SC, Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548-550.
- Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S, Orstavik KH, Tommerup N, Ledbetter DH, Beaudet AL (1994) Deletions of a differentially methylated CpG island at the *SNRPN* gene define a putative imprinting control region. *Nature Genet* **8**: 52-58.
- Sutcliffe JS, Jiang Y, Galjaard R-J, Matsuura T, Fang P, Kubota T, Christian SL, Bressler J, Cattanaach B, Ledbetter DH, Beaudet AL (1997) The E6-AP ubiquitin-protein ligase (*UBE3A*) gene is localized within a narrowed Angelman syndrome critical region. *Genome Res* **7**: 368-377.
- Szabo PE, Tang SH, Silva FJ, Tsark WM, Mann JR (2004) Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. *Mol Cell Biol* **11**: 4791-4800.
- Tamaru H und Selker EU (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* **414**: 277-283.
- Tate PH und Bird AP (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **3**: 226-231.
- Tauber M, Barbeau C, Jouret B, Pienkowski C, Malzac P, Moncla A, Rochiccioli P (2000) Auxological and endocrine evolution of 28 children with Prader-Willi syndrome : Effect of GH therapy in 14 children. *Horm Res* **53**: 279-287.
- Temple IK, James RS, Crolla JA, Sitch FL, Jacobs PA, Howell WM, Betts P, Baum JD, Shield JPH (1995) An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat Genet* **9**: 110-112.
- Tsai T-F, Jiang Y, Bressler J, Armstrong D, Beaudet AL (1999a) Paternal deletion from *Snrpn* to *Ube3a* in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **8**: 1357-1364.
- Tsai T-F, Armstrong D, Beaudet AL (1999b) *Necdin*-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* **22**: 15-16.
- Tycowski KT, Shu MD, Steitz JA (1993) A small nucleolar RNA is processed from an intron of the human gene encoding ribosomal protein S3. *Genes Dev* **7**: 1176-1190.
- Uetsuki T, Takagi K, Sugiura H, Yoshikawa K (1996) Structure and expression of the mouse *necdin* gene: Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem* **271**: 981-924.
- Vu TH und Hoffman AR (1997) Imprinting of the Angelman syndrome gene, *UBE3A*, is restricted to brain. *Nat Genet* **17**: 12-13.
- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P (2003) Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* **12**: (Review issue); R61-R68.
- Wevrick R, Kerns JA, Francke U (1994) Identification of a novel paternally expressed gene in the Prader-Willi syndrome region. *Hum Mol Genet* **3**: 1877-1882.

- Wey E, Bartholdi D, Riegel M, Nazlican H, Horsthemke B, Schinzel A, Baumer A (2005) Mosaic imprinting defect in a patient with an almost typical expression of the Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* **3**: 273-277.
- White S, Kalf M, Liu Q, Villerius M, Engelsma D, Kriek M, Vollebregt E, Bakker B, van Ommen GJ, Breuning MH, den Dunnen JT (2002) Comprehensive detection of genomic duplications and deletions in the DMD gene, by use of multiplex amplifiable probe hybridization. *Am J Hum Genet* **71**: 365-374.
- Williams CA, Zori RT, Stone JW, Gray BA, Cantu ES, Ostrer H (1990) Maternal origin of 15q11-13 deletions in Angelman syndrome suggests a role for genomic imprinting. *Am J Med Genet* **35**: 350-353.
- Williams CA, Angelman H, Clayton-Smith J, Driscoll DJ, Hendrickson JE, Knoll JHM, Magenis RE, Schinzel A, Wagstaff J, Whidden EM, Zori RT (1995) Angelman syndrome: a consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet* **56**: 237-238.
- Wirth J, Back E, Huttenhofer A, Nothwang HG, Lich C, Gross S, Menzel C, Schinzel A, Kioschis P, Tommerup N, Ropers HH, Horsthemke B, Buiting K (2001) A translocation breakpoint cluster disrupts the newly defined 3' end of the SNURF-SNRPN transcription unit on chromosome 15. *Hum Mol Genet* **10**: 201-210.
- Wudy SA, Hagemann S, Dempfle A, Ringler G, Blum WF, Berthold LD, Alzen G, Gortner L, Hebebrand J (2005) Children with idiopathic short stature are poor eaters and have decreased body mass index. *Pediatrics* **1**: e52-57.
- Xin Z, Allis CD, Wagstaff J (2001) Parent-specific complementary patterns of histone H3 lysine 9 and H3 lysine 4 methylation at the Prader-Willi syndrome imprinting center. *Am J Hum Genet* **69**: 1389-1394.
- Xin Z, Tachibana M, Guggiari M, Heard E, Shinkai Y, Wagstaff J (2003) Role of histone methyltransferase G9a in CpG methylation of the Prader-Willi syndrome imprinting center. *J Biol Chem* **278**: 14996-15000.
- Yang T, Adamson TE, Resnick JL, Leff S, Wevrick R, Francke U, Jenkins NA, Copeland NG, Brannan CI (1998) A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat Genet* **19**: 25-31.
- Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. *Eur J Hum Genet* **5**: 94-98.
- Zeschnigk M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer L, Lohmann DR (2004) A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res* **32**: e125.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mir auf unterschiedliche Weise bei meiner Doktorarbeit geholfen haben. Ich danke insbesondere:

Herrn Prof. Dr. Bernhard Horsthemke für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und die wertvollen Ideen und Anregungen zum Verlauf der Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm dafür, dass mir die Teilnahme an nationalen und internationalen wissenschaftlichen Tagungen ermöglicht worden ist.

Frau Dr. Karin Buiting für die vielen Ratschläge und Antworten auf meine Fragen und die wissenschaftlichen Diskussionen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Meinen Kolleginnen Stephanie Groß, Christina Lich, Corinna Zogel, Regina Kubica, Melanie Trommler und Inga Nowak für ihre jederzeit gewährte Unterstützung und technische Hilfe im Laboralltag.

Herrn Dr. Michael Zeschnigk für die Hilfestellung bei der Etablierung der quantitativen Realtime-PCR.

Frau Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach für die Beantwortung klinischer Fragen und die Hilfe bei der Kontaktierung und Materialbeschaffung verschiedener Patienten.

Herrn Dr. Stefan Böhringer für die mathematischen und statistischen Auswertungen der Ergebnisse.

Allen hier nicht genannten Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für eine schöne Arbeitsatmosphäre, für die gute Zusammenarbeit und für das Interesse an meiner Arbeit.

Meinem Mann Bülent Nazlican für das Korrekturlesen dieser Promotionsarbeit und dafür, dass er immer für mich da war und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.

LEBENS LAUF

Name: Hülya Nazlican

Geburtsdatum: 09.06.1974

Geburtsort: Malatya/Türkei

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung: 1980-1984 Grundschule, München
1984-1994 Klenzegymnasium, München
Abschluss: Abitur

Studium: 10/1994-07/2001 Biologiestudium an der Universität Bielefeld
Diplomarbeit bei Prof. Ragg in der AG Zelluläre Genetik an der Technischen Fakultät
Thema:
„Expressionsklonierung und Experimente zur Charakterisierung des Thrombininhibitors Heparinkofaktor II vom Huhn“
10/2001-03/2002 Medizinstudium an der Universität Duisburg-Essen
Seit 06/2002 Promotion als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der Universität Duisburg-Essen bei Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Hülya Nazlican

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Somatische Mosaik und atypische Deletionen bei Patienten mit Prader-Willi- und Angelman-Syndrom“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Hülya Nazlıcan befürworte.

Essen, den 10.10.2005

(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 10.10.2005

(Hülya Nazlıcan)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 10.10.2005

(Hülya Nazlıcan)